



Propriétés de métallation et de liaison à l'ADN de NikR d'*Escherichia coli* et de NikR et FUR d'*Helicobacter pylori*

Caroline Fauquant

► To cite this version:

Caroline Fauquant. Propriétés de métallation et de liaison à l'ADN de NikR d'*Escherichia coli* et de NikR et FUR d'*Helicobacter pylori*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00259691

HAL Id: tel-00259691

<https://theses.hal.science/tel-00259691>

Submitted on 29 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

présentée par

Caroline FAUQUANT

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : **CHIMIE BIOLOGIE**

Propriétés de métallation et de liaison à l'ADN
de NikR d'*Escherichia coli* et
de NikR et FUR d'*Helicobacter pylori*

Soutenue publiquement le 23 novembre 2007

JURY

Pr. Hans GEISELMANN
Dr. Hilde DE REUSE
Dr. William NASSER
Dr. Marie-Andrée MANDRAND-BERTHELOT
Dr. Juan FONTECILLA-CAMPS
Dr. Isabelle MICHAUD-SORET

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

Thèse préparée au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249 CNRS/CEA/UJF)
rattaché à l'Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant au CEA de Grenoble.

Remerciements

Je remercie les docteurs Hilde de Reuse et William Nasser d'avoir bien voulu être rapporteurs de cette thèse. Je remercie le professeur Hans Geiselmann ainsi que les docteurs Marie-Andrée Mandrand-Berthelot et Juan Fontecilla-Camps d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également ma directrice de thèse, Isabelle Michaud-Soret, pour la confiance qu'elle m'a témoigné au cours de ces trois années et d'avoir su trouver les mots justes pour me remotiver dans les moments de doute.

Merci aux membres du laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux du CEA-Grenoble, dirigé par le professeur Marc Fontecave, et plus spécialement ceux de l'équipe PMB de m'avoir accueillie.

Un grand merci plus particulièrement à Françoise Berthon et à Victor Duarte pour leur gentillesse. Merci à Christelle Caux-Thang pour son dynamisme. Cela a été un véritable plaisir de travailler ensemble.

Je remercie également Rutger Diederix qui m'a initiée aux plaisirs des métaux et surtout d'EcNikR...

Je n'oublie pas mes collègues de galères Abdelnasser El Ghazouani avec qui j'ai partagé la paillasse et le bureau, Daouda Traore, Eric Goure et enfin Sylvia Vitale qui vient de rejoindre le cercle très privé des expérimentateurs de FUR.

Je remercie également les membres de l'équipe TRIM pour leur accueil lors de ma dernière année de thèse.

Je remercie aussi Agnès Rodrigue qui a été mon enseignante et qui est devenue une collaboratrice, de m'avoir si gentiment accueillie chez elle lorsque j'ai travaillé sur Lyon.

Je remercie également Kristine Schauer, Cyril Dian, Ulrike Kapp, Ganesh Natrajan et Laurent Terradot pour leurs contributions dans le projet NikR d'*Helicobacter pylori*.

Enfin je tiens à remercier mes proches qui ont toujours été là pendant les coups durs avant mais aussi pendant la thèse.

Je remercie également Catherine et Patrick. Mes week-ends de détente à Aix-les-bains me manqueront.

Cette thèse m'aura certes ouvert de nouvelles perspectives professionnelles mais elle m'aura surtout apporté la plus importante des satisfactions personnelles : Ludovic.

Merci à toi d'avoir été là pendant ces trois années et de m'avoir soutenue en tant que collègue mais aussi en tant que compagnon et aujourd'hui en tant qu'époux. Tu as été parfaitement à la « hauteur » de ta mission malgré les kilomètres qui nous séparent.

Table des matières

Liste des illustrations et des tableaux	- 11 -
Abréviations	- 21 -
Chapitre I La transcription et les métallorégulateurs chez les procaryotes	- 27 -
I.1. La transcription chez les procaryotes	- 30 -
<i>I.1.1. Généralités</i>	<i>- 30 -</i>
<i>I.1.2. La transcription en quelques mots</i>	<i>- 30 -</i>
<i>I.1.3. La régulation de la transcription</i>	<i>- 31 -</i>
I.2. Les métallorégulateurs chez les procaryotes	- 36 -
<i>I.2.1. La famille des régulateurs MerR</i>	<i>- 37 -</i>
<i>I.2.2. La famille des régulateurs SmtB/ArsR</i>	<i>- 43 -</i>
<i>I.2.3. La famille des régulateurs DtxR</i>	<i>- 47 -</i>
<i>I.2.4. La famille des régulateurs FUR</i>	<i>- 54 -</i>
<i>I.2.5. La famille des régulateurs NikR</i>	<i>- 66 -</i>
I.3. NikR chez <i>Escherichia coli</i>	- 68 -
<i>I.3.1. La séquence protéique de EcNikR</i>	<i>- 68 -</i>
<i>I.3.2. Liaison du métal</i>	<i>- 69 -</i>
<i>I.3.3. Caractéristiques structurales</i>	<i>- 72 -</i>
<i>I.3.4. Mode d'action de la protéine</i>	<i>- 78 -</i>
<i>I.3.5. NikR et l'homéostasie du nickel chez E. coli</i>	<i>- 81 -</i>
I.4. NikR chez <i>Helicobacter pylori</i>	- 88 -
<i>I.4.1. La séquence protéique d'HpNikR</i>	<i>- 88 -</i>
<i>I.4.2. Caractéristiques générales</i>	<i>- 89 -</i>
<i>I.4.3. Caractéristiques structurales</i>	<i>- 90 -</i>
<i>I.4.4. Mode d'action de la protéine</i>	<i>- 95 -</i>
<i>I.4.5. NikR et le nickel chez H. pylori</i>	<i>- 100 -</i>
I.5. Les autres métallorégulateurs du Ni(II)	- 110 -
I.6. Présentation du travail	- 111 -
I.7. Références	- 113 -

Chapitre II Les propriétés d'EcNikR	- 125 -
II.1. Les fondements de l'étude d'EcNikR	- 127 -
II.1.1. <i>La métallation d'EcNikR par le nickel</i>	- 127 -
II.1.2. <i>Une affinité de l'ordre du picomolaire ?</i>	- 129 -
II.1.3. <i>Une caractérisation en deux temps</i>	- 129 -
II.2. L'affinité de EcNikR pour le nickel : Sous-micromolaire !	- 131 -
II.3. L'agrégation métal-dépendante d'EcNikR	- 137 -
II.3.1. <i>Un phénomène réversible</i>	- 137 -
II.3.2. <i>Un phénomène dépendant de la métallation de sites annexes</i>	- 138 -
II.4. Effet du pH et du Ni(II) sur la métallation	- 138 -
II.4.1. <i>Résumé</i>	- 138 -
II.4.2. <i>Publication</i>	- 139 -
II.5. Le mutant EcNikR 3HA	- 153 -
II.5.1. <i>Obtention de la protéine</i>	- 153 -
II.5.2. <i>Caractéristique de la protéine purifiée</i>	- 154 -
II.6. La liaison à l'ADN de EcNikR	- 161 -
II.6.1. <i>Détermination de la stoechiométrie de liaison EcNikR:ADN</i>	- 161 -
II.6.2. <i>La liaison à l'ADN suivie par anisotropie de fluorescence</i>	- 162 -
II.7. Discussion et Conclusion	- 164 -
II.7.1. <i>Liaison du nickel dans deux classes de sites métalliques</i>	- 164 -
II.7.2. <i>Fonction des sites secondaires</i>	- 167 -
II.7.3. <i>Mécanisme d'action d'EcNikR</i>	- 169 -
II.8. Références	- 172 -
Chapitre III HpNikR et les métaux	- 175 -
III.1. L'objectif de l'étude	- 177 -
III.2. Purification d'HpNikR WT	- 177 -
III.2.1. <i>L'obtention des extraits protéiques</i>	- 178 -
III.2.2. <i>Purification sur une colonne échangeuse d'anions</i>	- 178 -
III.2.3. <i>Purification par filtration sur gel</i>	- 179 -
III.3. Liaison des métaux	- 181 -
III.3.1. <i>Métallation « simple » d'HpNikR</i>	- 181 -
III.3.2. <i>Métallation « multiple » d'HpNikR</i>	- 188 -

III.4.	Effets des métaux sur la conformation	- 192 -
III.4.1.	<i>Effets des métaux suivis par la fluorescence du tryptophane</i>	- 192 -
III.4.2.	<i>Effets du nickel suivis avec la fluorescence de l'ANS</i>	- 196 -
III.5.	Caractéristiques du mutant H99A-H101A-C107S : M1	- 198 -
III.5.1.	<i>Généralités</i>	- 198 -
III.5.2.	<i>Propriétés de métallation</i>	- 200 -
III.6.	Discussion	- 202 -
III.7.	Références	- 207 -
Chapitre IV	La liaison à l'ADN d'HpNikR	- 209 -
IV.1.	La liaison sur <i>pureA</i> et <i>pnixA</i>	- 211 -
IV.1.1.	<i>Objectif de l'étude</i>	- 211 -
IV.1.2.	<i>Choix des séquences oligonucléotidiques</i>	- 212 -
IV.1.3.	<i>Avancement de l'étude cristallographique</i>	- 213 -
IV.1.4.	<i>Détermination de la stoechiométrie de liaison à l'ADN</i>	- 214 -
IV.1.5.	<i>Affinité d'HpNikR pour <i>pnixA</i> et <i>pureA</i></i>	- 215 -
IV.1.6.	<i>Les dernières avancées de la littérature ...</i>	- 218 -
IV.1.7.	<i>Discussion</i>	- 224 -
IV.2.	La liaison sur les motifs <i>NiFu</i> et <i>nikRS2</i> de la région intergénique : <i>nikR-exbB</i>	- 229 -
IV.2.1.	<i>Objectif de l'étude</i>	- 229 -
IV.2.2.	<i>Choix des séquences oligonucléotidiques</i>	- 230 -
IV.2.3.	<i>Affinité d'HpNikR pour <i>NiFu</i> et <i>nikRS2</i></i>	- 231 -
IV.2.4.	<i>Discussion : Liaison sur <i>NiFu</i> et <i>nikRS2</i> versus <i>pnixA</i> et <i>pureA</i></i>	- 239 -
IV.3.	Liaison d'HpNikR sur la région intergénique suivie avec un test nucléase	- 242 -
IV.3.1.	<i>Mesure de la protection en absence de métal autre que le magnésium</i>	- 244 -
IV.3.2.	<i>Mesure de la protection en présence de métal</i>	- 245 -
IV.3.3.	<i>Mesure de la liaison d'HpNikR sur les motifs prédits</i>	- 248 -
IV.3.4.	<i>Discussion : Liaison sur <i>NiFu</i> et <i>nikRS2</i> selon la technique employée</i>	- 249 -
IV.4.	Références	- 253 -
Chapitre V	Caractérisation de FUR d'<i>Helicobacter pylori</i>	- 255 -
V.1.	L'objectif de l'étude d'HpFUR	- 257 -

V.2.	Données bibliographiques sur HpFUR	- 257 -
V.2.1.	<i>La séquence protéique d'HpFUR</i>	- 258 -
V.2.2.	<i>Caractéristiques d'HpFUR</i>	- 260 -
V.2.3.	<i>La régulation transcriptionnelle par HpFUR.</i>	- 261 -
V.3.	Purification d'HpFUR WT	- 266 -
V.3.1.	<i>L'obtention des extraits protéiques</i>	- 266 -
V.3.2.	<i>Purification sur une colonne échangeuse de cations</i>	- 267 -
V.3.3.	<i>Purification par filtration sur gel</i>	- 267 -
V.4.	Etat d'oligomérisation d'HpFUR WT	- 269 -
V.5.	La liaison du métal par HpFUR	- 271 -
V.5.1.	<i>HpFUR purifiée est métallée</i>	- 271 -
V.5.2.	<i>La métallation d'HpFUR par le cobalt</i>	- 273 -
V.6.	Effet du métal sur la conformation d'HpFUR	- 277 -
V.6.1.	<i>Effet des métaux suivi par dichroïsme circulaire</i>	- 277 -
V.6.2.	<i>Effet des métaux suivi par la fluorescence du tryptophane</i>	- 282 -
V.7.	La liaison à l'ADN : région intergénique <i>nikR-exbB</i>	- 287 -
V.7.1.	<i>Liaison d'HpFUR apo</i>	- 288 -
V.7.2.	<i>Liaison d'HpFUR en présence de différents métaux.</i>	- 289 -
V.8.	Bilan de la caractérisation	- 293 -
V.9.	Références	- 297 -
Chapitre VI	Conclusion Générale	- 299 -
VI.1.	Comparaison des propriétés de métallation d'Ec et d'HpNikR	- 302 -
VI.2.	Comparaison des propriétés de liaison d'Ec et d'HpNikR à l'ADN	- 307 -
VI.3.	La caractérisation d'HpFUR	- 312 -
VI.4.	Références	- 315 -
Chapitre VII	Matériel & Méthodes	- 317 -
VII.1.	Matériel plasmidique	- 319 -
VII.1.1.	<i>Plasmides obtenus par collaboration</i>	- 319 -
VII.1.2.	<i>Plasmides modifiés par mutagenèse dirigée</i>	- 320 -
VII.1.3.	<i>Tableau récapitulatif des plasmides</i>	- 320 -

VII.2.	Mutagenèse dirigée	- 321 -
VII.2.1.	<i>Principe</i>	- 321 -
VII.2.2.	<i>pET28_nikR WT</i>	- 321 -
VII.2.3.	<i>pET28_nikR 3HA</i>	- 322 -
VII.2.4.	<i>Le plasmide pHP2S utilisé pour le test nucléase</i>	- 323 -
VII.3.	Surproduction et Purification des protéines NikR	- 325 -
VII.3.1.	<i>EcNikR</i>	- 325 -
VII.3.2.	<i>HpNikR : Sauvage et le mutant M1</i>	- 327 -
VII.4.	Surproduction et Purification de FUR d'<i>Helicobacter pylori</i>	- 329 -
VII.5.	Dosage colorimétrique des métaux avec du 4-(2-pyridylazo) resorcinol-	330 -
VII.6.	Diffusion dynamique de la lumière	- 332 -
VII.7.	Spectrométrie d'absorption atomique	- 332 -
VII.8.	Dichroïsme circulaire	- 332 -
VII.8.1.	<i>Les conditions de mesures</i>	- 333 -
VII.8.2.	<i>Comparaison de HpNikR WT et de son mutant M1</i>	- 333 -
VII.8.3.	<i>Titration en Ni(II) de EcNikR WT et de son mutant 3HA</i>	- 334 -
VII.8.4.	<i>Titration métallique HpFUR</i>	- 334 -
VII.9.	Suivi de la métallation par spectroscopie UV-Visible	- 335 -
VII.10.	Liaison sur filtre : Liaison du ⁶³Ni par EcNikR	- 335 -
VII.11.	Spectroscopie de Fluorescence	- 337 -
VII.11.1.	<i>Fluorescence des tryptophanes</i>	- 337 -
VII.11.2.	<i>Fluorescence du 8-anilino-1-naphtalène sulfonate (ANS)</i>	- 338 -
VII.11.3.	<i>L'anisotropie de fluorescence</i>	- 339 -
VII.12.	Retard sur gel ou EMSA	- 342 -
VII.12.1.	<i>Principe de l'EMSA</i>	- 342 -
VII.12.2.	<i>Principe de l'analyse de Ferguson</i>	- 343 -
VII.12.3.	<i>Retard sur Gel : Fluorescence</i>	- 344 -
VII.12.4.	<i>Retard sur gel : Radioactivité</i>	- 346 -
VII.13.	Test de protection à la nucléase	- 348 -
VII.13.1.	<i>Principe</i>	- 348 -
VII.13.2.	<i>Plasmide EcNikR : pP342</i>	- 348 -
VII.13.3.	<i>Plasmide HpNikR et HpFUR : pHP2S</i>	- 349 -
VII.14.	Cristallisation HpNikR:nixA et HpNikR:ureA	- 351 -

VII.15. Autres techniques	- 351 -
VII.16. Références	- 352 -
Annexes	- 363 -
Annexe A : Matériel supplémentaire de la communication	- 357 -
Annexe B : Modèles appliqués pour l'ajustement des données	- 364 -
Annexe C : Liaison d'HpNikR sur <i>NiFu</i> et <i>nikRS2</i> mesurée par EMSA	- 366 -
Résumé	- 369 -

Liste des Illustrations

Figure I.1 Représentation schématisée des différentes étapes de l'initiation de la transcription avec l'ARN polymérase associée à son facteur σ	- 31 -
Figure I.2 Machinerie de transcription chez les procaryotes avec l'ARN polymérase associée au facteur σ positionnée sur les régions -35 et -10 du promoteur d'un gène.....	- 32 -
Figure I.3 Quelques mécanismes de régulation de la transcription par des facteurs de transcription (FT).....	- 35 -
Figure I.4 Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de Cu(I)-CueR de résolution 2.2 Å (Changela <i>et al.</i> , 2003).	- 38 -
Figure I.5 Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de BrmR-TPP-ADN de résolution 3 Å (Heldwein & Brennan, 2001).....	- 39 -
Figure I.6 Mécanisme d'action des métallorégulateurs de la famille MerR. En absence de métal, le métallorégulateur empêche la transcription des gènes.....	- 40 -
Figure I.7 Organisation de la région intergénique : merR – merTPAD du transposon Tn501 (Brown <i>et al.</i> , 2003; Hobman <i>et al.</i> , 2005).....	- 41 -
Figure I.8 Représentation schématisée (inspiré de Hobman <i>et al.</i> (2005)) de la régulation du stress « mercure » chez <i>E.coli</i> ayant l'opéron <i>mer</i> du transposon Tn501.....	- 42 -
Figure I.9 Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de (A) apo-SmtB (Eicken <i>et al.</i> , 2003), (B) "apo" CadC (Ye <i>et al.</i> , 2005).....	- 45 -
Figure I.10 Mécanisme d'action des métallorégulateurs de la famille SmtB/ArsR. En absence de métal, le métallorégulateur empêche la transcription des gènes.....	- 47 -
Figure I.11 Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de (A) Visualisation de la structure d'une unité monomérique d'apo-DtxR dimérique (Pohl <i>et al.</i> , 1998), (B) apo-dtxR (Schiering <i>et al.</i> , 1995) et (C) Co-DtxR (Pohl <i>et al.</i> , 1999a).....	- 49 -
Figure I.12 Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de (A) apo-MntR (DeWitt <i>et al.</i> , 2007), (B) Mn-MntR (Kliegman <i>et al.</i> , 2006).....	- 50 -
Figure I.13 Modèles d'activation pour IdeR (Chou <i>et al.</i> , 2004; Wisedchaisri <i>et al.</i> , 2004; Wisedchaisri <i>et al.</i> , 2007) / DtxR (D'Aquino <i>et al.</i> , 2005; Love <i>et al.</i> , 2004) / MntR (DeWitt <i>et al.</i> , 2007) en plusieurs étapes.	- 52 -
Figure I.14 Séquence consensus reconnue par DtxR chez <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (Lee & Holmes, 2000).....	- 53 -
Figure I.15 Structure du complexe Co-DtxR-ADN (Pohl <i>et al.</i> , 1999a). Le complexe présente une stoechiométrie de 2 Homodimères:1 ADN.....	- 53 -
Figure I.16 Mécanisme d'action simplifié des métallorégulateurs de la famille DtxR. En absence de métal, la transcription des gènes a lieu.....	- 54 -
Figure I.17 Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de (A) Zn ₁ Zn ₂ PaFUR (Pohl <i>et al.</i> , 2003), (B) Zn ₁ Zn ₂ Zn ₃ MtZur (Lucarelli <i>et al.</i> , 2007), (C) Zn ₁ BsPerR (Traore <i>et al.</i> , 2006).....	- 57 -
Figure I.18 Les différents ligands des sites métalliques de plusieurs membres de la famille FUR.....	- 58 -
Figure I.19 Schéma des mécanismes d'activation hypothétiques de BsPerR et de EcFUR.....	- 61 -
Figure I.20 Les différents modes de régulations des protéines FUR (Lee & Helmann, 2007)	- 63 -
Figure I.21 A) Séquence consensus de la FUR box où w correspond à A/T (Escolar <i>et al.</i> , 1998). B) Mode de liaison de FUR à l'ADN, reconnaissance d'un motif 6-1-6 (Lavrrar & McIntosh, 2003).....	- 63 -
Figure I.22 Mécanisme d'action de FUR d' <i>E.coli</i> dans des conditions de carence en fer (partie supérieure du schéma) ou de forte concentration en fer (partie inférieure du schéma) : Contrôle de l'homéostasie du fer pour des régulations négatives et positives.....	- 65 -
Figure I.23 Séquence protéique de NikR de <i>E.coli</i>	- 68 -

Figure I.24 Alignement d'une sélection de séquences des protéines NikR de différents micro-organismes...	- 69 -
Figure I.25 Ligands du site de haute affinité d'EcNikR ; His 87, 89 et Cys 95 proviennent d'une première unité monomérique et His 76' provient d'une seconde sous-unité adjacente.	- 70 -
Figure I.26 A) Structure tridimensionnelle de EcNikR apo de résolution 2.3Å (Schreiter <i>et al.</i> , 2003). Le domaine N-ter d'une sous unité monomérique avec le repliement ruban-hélice-hélice est en bleu (B) et le domaine C-ter équivalent est en jaune (B).	- 73 -
Figure I.27 Structures tridimensionnelles de EcNikR métallée et apo (Schreiter <i>et al.</i> , 2003; Schreiter <i>et al.</i> , 2006).	- 74 -
Figure I.28 Structures tridimensionnelles de PhNikR métallée.	- 75 -
Figure I.29 Structure tridimensionnelle du complexe EcNikR-Ni-ADN.	- 76 -
Figure I.30 Alignement des séquences de EcNikR et PhNikR sur lesquelles ont été précisés les ligands des sites de haute affinité * et de basse affinité à Ni(II) ● pour PhNikR et K ⁺ ○ pour EcNikR.	- 77 -
Figure I.31 Dyade symétrique de la région opératrice du promoteur <i>pnikA</i> liée par EcNikR métallée.	- 78 -
Figure I.32 Mécanismes d'action d'EcNikR en présence de métal et d'ADN.	- 80 -
Figure I.33 Les différents partenaires de l'homéostasie du nickel (Dosanjh & Michel, 2006; Iwig <i>et al.</i> , 2006; Meier, 2005)	- 82 -
Figure I.34 La régulation de la concentration en nickel en anaérobiose par les régulateurs FNR, NikR et RcnR	- 87 -
Figure I.35 Alignement des séquences protéiques d'HpNikR et d'EcNikR.	- 88 -
Figure I.36 Structure tridimensionnelle de Apo-HpNikR, de résolution 2.1 Å, en conformation trans-fermée avec une vue de face et de dessus pour mieux noter l'asymétrie des domaines de tétramérisation (Dian <i>et al.</i> , 2006).	- 91 -
Figure I.37 Structure tridimensionnelle de Holo-HpNikR (forme 1) (2.3 Å) en conformation trans-fermée avec une vue de face et de dessus pour mieux noter l'asymétrie des domaines de tétramérisation (Dian <i>et al.</i> , 2006).	- 92 -
Figure I.38 Les sites métalliques décrits chez HpNikR : le site de haute affinité, le site intermédiaire et le site externe.	- 92 -
Figure I.39 Cheminement hypothétique du nickel dans HpNikR en vue de son activation (inspiré de (Dian <i>et al.</i> , 2006)).	- 94 -
Figure I.40 Séquence en amont du gène <i>ureA</i> chez <i>Helicobacter pylori</i> 26695.	- 96 -
Figure I.41 Séquence protégée par HpNikR-Ni en amont du gène <i>nixA</i> chez <i>Helicobacter pylori</i> 26695.	- 97 -
Figure I.42 Organisation de la région intergénique <i>nikR-exbB</i> .	- 98 -
Figure I.43 Région intergénique <i>nikR-exbB</i> .	- 99 -
Figure I.44 Mécanisme d'action hypothétique d'HpNikR pour la liaison sur <i>pureA</i> et <i>pnixA</i> (Abraham <i>et al.</i> , 2006; Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh <i>et al.</i> , 2007).	- 100 -
Figure I.45 Le nickel chez <i>Helicobacter pylori</i> : le métabolisme et l'homéostasie.	- 102 -
Figure I.46 Structure de l'hydrogénase à NiFe de <i>D. gigas</i> (code PDB : 2FRV).	- 103 -
Figure I.47 Mécanisme théorique de la maturation de l'hydrogénase à NiFe chez <i>H pylori</i> en 4 étapes.	- 103 -
Figure I.48 Structure de l'uréase d' <i>Helicobacter pylori</i> (code PDB : 1e9Z).	- 105 -
Figure I.49 Maturation de l'uréase chez <i>H pylori</i> .	- 105 -
Figure I.50 Mécanisme mis en jeu pour l'acclimation d' <i>H. pylori</i> à l'acidité (Scott <i>et al.</i> , 2007).	- 107 -
Figure I.51 Organisation de la séquence en amont de <i>pureA</i> (P1) et <i>pureI</i> (P2).	- 107 -
Figure II.1 Métallation de EcNikR par le nickel.	- 128 -
Figure II.2 Précipitation de EcNikR Q2E en fonction du nickel.	- 137 -
Figure II.3 Comparaison du contenu et de la localisation des histidines entre EcNikR (A) et HpNikR (B).	- 139 -

Figure II.4 Séquence de la protéine EcNikR 3HA.....	- 153 -
Figure II.5 Obtention de la protéine EcNikR 3HA..	- 153 -
Figure II.6 EcNikR 3HA purifiée.....	- 154 -
Figure II.7 Gamme étalon du complexe PAR-Ni(II) en fonction du nickel ajouté..	- 155 -
Figure II.8 Spectres CD dans l'UV-lointain des différentes structures secondaire.....	- 155 -
Figure II.9 Structuration d'EcNikR 3HA-WT à 10µM suivie par dichroïsme circulaire.....	- 157 -
Figure II.10 Structuration d'EcNikR 3HA et WT à 15µM suivie par dichroïsme circulaire dans l'UV proche	- 158 -
Figure II.11 Structure tridimensionnelle de EcNikR WT métallée (Schreiter <i>et al.</i> , 2006).....	- 159 -
Figure II.12 Métallation du mutant EcNikR 3HA par le nickel.....	- 159 -
Figure II.13 Séquence de 46 pb présentant le motif lié (en gras) par EcNikR sur le promoteur <i>pnikA</i>	- 161 -
Figure II.14 Retards sur gel visualisés par fluorescence montrant la migration de l'ADN.....	- 161 -
Figure II.15 Liaison à l'ADN suivie par anisotropie de fluorescence au cours d'une titration par le nickel. .	- 163 -
Figure II.16 Modèle de liaison à l'ADN par EcNikR (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2002).	- 167 -
Figure II.17 Structure tridimensionnelle du complexe EcNikR-Ni-ADN sur laquelle a été superposée l'emplacement des Ni(II) liés à la protéine après que le complexe ait été trempé dans du Ni(II)..	- 168 -
Figure II.18 Mécanisme d'activation et d'action d'EcNikR. Le cadre délimite un aspect du mécanisme qui pourrait ne pas avoir de réalité physiologique.....	- 170 -
Figure III.1 Production de NikR d' <i>Helicobacter pylori</i>	- 178 -
Figure III.2 Profil de purification d'HpNikR sur une colonne échangeuse d'anions.....	- 179 -
Figure III.3 Profil de purification d'HpNikR sur une colonne d'exclusion moléculaire.....	- 179 -
Figure III.4 Profil d'HpNikR obtenu sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique	- 180 -
Figure III.5 Métallation d'HpNikR par le nickel.....	- 182 -
Figure III.6 Titration d'HpNikR par le nickel à différents pH.....	- 183 -
Figure III.7 Métallation d'HpNikR par le cuivre.....	- 184 -
Figure III.8 Métallation d'HpNikR par le cobalt.....	- 186 -
Figure III.9 Métallation d'HpNikR par le cobalt au-delà de 1.2 équivalents ajoutés.....	- 187 -
Figure III.10 Métallation d'HpNikR 205µM par le Co(II) puis par le Ni(II).....	- 188 -
Figure III.11 Titration d'HpNikR par le cobalt puis par le nickel.....	- 189 -
Figure III.12 Métallation d'HpNikR 173µM par le nickel puis par le cobalt.....	- 190 -
Figure III.13 Métallation d'HpNikR 205µM par le Mn(II) puis par le Ni(II).....	- 190 -
Figure III.14 Structure tridimensionnelle d'HpNikR sur laquelle ont été indiqués les tryptophanes.....	- 192 -
Figure III.15 Spectre d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpNikR apo.....	- 193 -
Figure III.16 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpNikR apo et en présence de différents métaux (Ni/Cu/Co).....	- 194 -
Figure III.17 Evolution du quench de la fluorescence du tryptophane d'HpNikR.....	- 195 -
Figure III.18 Schéma du positionnement moyen des tryptophanes dans la structure d'HpNikR en fonction du basculement des domaines de liaison à l'ADN.....	- 196 -
Figure III.19 Effet du Ni(II) sur la conformation d'HpNikR mesuré par le suivi de la fluorescence de l'ANS..	- 197 -
Figure III.20 Effet du Co(II), Cu(II) et du Mn(II) sur la conformation d'HpNikR mesuré par le suivi de la fluorescence de l'ANS.....	- 198 -

Figure III.21 A) SDS-PAGE d'HpNikR M1 purifiée B) Etat oligomérique d'HpNikM1..	- 199 -
Figure III.22 A) Spectres CD d'HpNikR WT et M1 enregistrés dans l'UV lointain et B) dans l'UV proche	- 199 -
Figure III.23 Métallation d'HpNikR M1 par le nickel	- 200 -
Figure III.24 Effets du Ni(II) et de la mutation sur la conformation d'HpNikR M1	- 201 -
Figure III.25 Visualisation d'un site intermédiaire.	- 205 -
Figure III.26 Titration d'HpNikR par le nickel à pH 5,2	- 205 -
Figure III.27 Effet du métal sur la métallation des sites de haute affinité d'HpNikR.	- 206 -
Figure IV.1 A) Séquence en amont du gène <i>ureA</i> chez <i>Helicobacter pylori</i> 26695. B) Séquence protégée par Strep-tag HpNikR sur <i>pnixA</i>	- 211 -
Figure IV.2 Suivi par EMSA de la liaison d'HpNikR sur des oligonucléotides <i>pureA</i> et <i>pnixA</i> de différentes tailles en présence d'un excès de Ni(II)	- 213 -
Figure IV.3 Détermination de la stoechiométrie de liaison d'HpNikR à l'ADN en présence d'un excès de Ni(II) 100µM. 4 séquences ont été testées A) <i>pureA</i> 40pb B) <i>pnixA</i> 43pb C) <i>NiFu</i> 47pb et D) <i>nikRS2</i> 44pb..	- 214 -
Figure IV.4 Liaison d'HpNikR à <i>pnixA32</i> en présence d'un excès de Ni(II)	- 215 -
Figure IV.5 Liaison d'HpNikR à <i>pureA32</i> en présence d'un excès de Ni(II).	- 216 -
Figure IV.6 Séquences opératrices liées par HpNikR pour réguler la transcription des gènes <i>ureAB</i> et <i>nixA</i> . -	217 -
Figure IV.7 Séquence oligonucléotidique utilisée lors de l'étude de Dosanjh et al.	- 218 -
Figure IV.8 Liaison d'HpNikR à <i>pureA</i> -Fl (40pb) suivie par anisotropie de fluorescence.	- 219 -
Figure IV.9 Effet des sels contenus dans le tampon de complexation ADN/Protéine sur la liaison d'HpNikR à <i>pureA32</i> ..	- 220 -
Figure IV.10 Effets des sels contenus dans le tampon d'incubation sur la liaison d'HpNikR sur <i>pureA32</i> lorsque du Ni(II) est ajouté dans le tampon de migration.	- 221 -
Figure IV.11 Liaison d'HpNikR sur <i>pureA32</i> lorsque 3mM de Mg(II) sont ajoutés au tampon de migration.	- 222 -
Figure IV.12 Liaison d'HpNikR sur <i>pureA32</i> et <i>pnixA32</i> en présence de 100µM de Mn(II) dans le tampon d'incubation et de migration.	- 223 -
Figure IV.13 Modèle de liaison de Ni-HpNikR sur une séquence opératrice de 32pb riche en AT comparée à la structure du complexe Ni-EcNikR-ADN (Dian, 2007)..	- 225 -
Figure IV.14 Séquences opératrices liées par HpNikR pour réguler la transcription des gènes <i>ureAB</i> et <i>nixA</i>	- 227 -
Figure IV.15 Mode d'activation d'HpNikR pour la liaison sur <i>pureA</i> et <i>pnixA</i> . HpNikR peut être activée avec du Ni(II), du Mn(II) ou dans une moindre mesure par du Mg(II). La localisation du site stabilisateur est indéfinie	- 228 -
Figure IV.16 Liaison de HpNikR et HpFUR sur la région intergénique au niveau des promoteurs de <i>pnikR</i> et <i>pexbB</i> (schéma inspiré de (Delany <i>et al.</i> , 2005)).	- 229 -
Figure IV.17 Liaison d'HpNikR à l'ADN (A : <i>NiFu</i> _ B : <i>nikRS2</i>) en présence d'un excès de Ni(II) mesurée en fluorescence.	- 231 -
Figure IV.18 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en présence d'un excès de Ni(II) dans le tampon de complexation et de migration.	- 232 -
Figure IV.19 Liaison d'HpNikR à <i>pnikR</i> mesurée en EMSA en présence de 50µM de NiCl ₂ . Gel extrait de (Benanti & Chivers, 2007)	- 233 -
Figure IV.20 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en présence de 100µM de Mn(II) dans le tampon de complexation et dans le tampon de migration.	- 234 -
Figure IV.21 Liaison d'HpNikR sur <i>NiFu</i> (★) et <i>nikRS2</i> (■) en présence de 100µM de MnCl ₂	- 234 -

Figure IV.22 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en présence de Mg(II) en incubation et en présence de 100µM de Mn(II) dans le tampon de complexation et de migration..	- 236 -
Figure IV.23 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en présence de 100µM de NiCl ₂ dans le tampon de complexation et de 100µM MnCl ₂ dans le tampon de migration..	- 236 -
Figure IV.24 Liaison d'HpNikR sur <i>NiFu</i> (★) et <i>nikRS2</i> (■) après une incubation en présence d'un excès de Ni(II) et une migration en présence d'un excès de Mn(II)..	- 237 -
Figure IV.25 Liaison à l'ADN (A : <i>NiFu</i> _ B : <i>nikRS2</i>) en présence d'un excès de Co(II) en migration..	- 238 -
Figure IV.26 Mode d'activation d'HpNikR pour la liaison sur <i>pureA/pnixA</i> versus <i>NiFu/nikRS2</i>	- 240 -
Figure IV.27 Principe du test de protection à la nucléase.....	- 243 -
Figure IV.28 Séquence intergénique introduite dans le pUC18 entre les sites de coupure de HindIII et BamHI (précisés en italique, ombré).....	- 243 -
Figure IV.29 Carte du plasmide pHP2S.....	- 244 -
Figure IV.30 Test de protection à la nucléase en absence de métal dans le tampon de complexation.....	- 244 -
Figure IV.31 Test de protection à la nucléase en présence de MnCl ₂ et de NiCl ₂ dans le tampon de complexation.....	- 245 -
Figure IV.32 Test de protection à la nucléase en présence de MnCl ₂ ou de NiCl ₂ dans le tampon de complexation.....	- 246 -
Figure IV.33 Test de protection à la nucléase en présence de NiCl ₂ (et de MnCl ₂) dans le tampon de complexation.....	- 247 -
Figure IV.34 Extrait de la séquence plasmidique du pUC18.....	- 247 -
Figure IV.35 Test de protection à la nucléase en présence de NiCl ₂ (et de MnCl ₂) dans le tampon de complexation.....	- 248 -
Figure V.1 Alignement de séquences des protéines FUR de différents micro-organismes.....	- 257 -
Figure V.2 Séquence protéique et structure secondaire de FUR d' <i>H.pylori</i> comparées à celles d'EcFUR et de PaFUR.....	- 259 -
Figure V.3 Schéma sur lequel figure la localisation des sites liés par HpFUR dans sa région promotrice. HpFUR lie trois sites : OI, OII et OIII pour lesquels l'affinité est décroissante..	- 264 -
Figure V.4 Modèle de régulation de l'expression transcriptionnelle de <i>fur</i> par HpFUR (tiré de (Delany <i>et al.</i> , 2003))..	- 265 -
Figure V.5 Production de FUR d' <i>Helicobacter pylori</i>	- 266 -
Figure V.6 Profil de purification d'HpFUR sur une colonne échangeuse de cations.....	- 267 -
Figure V.7 Profil de purification d'HpFUR sur une colonne d'exclusion moléculaire.....	- 268 -
Figure V.8 SDS-PAGE d'HpFUR purifiée.....	- 268 -
Figure V.9 Spectre d'absorption UV-Vis d'HpFUR apo à 20µM dans un tampon.....	- 269 -
Figure V.10 Courbe de calibration de la Superdex 75 analytique.....	- 270 -
Figure V.11 Profil d'élution d'HpFUR à 25µM obtenu sur une colonne d'exclusion moléculaire.....	- 270 -
Figure V.12 Profils d'élution d'HpFUR à 25µM obtenus sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique après des traitements à l'EDTA.....	- 271 -
Figure V.13 Gamme étalon du zinc complexé au PAR en fonction de la concentration en zinc.....	- 272 -
Figure V.14 Métallation d'HpFUR à 450 µM par le cobalt.....	- 273 -
Figure V.15 Métallation d'HpFUR par le cobalt.....	- 274 -
Figure V.16 Profils d'élution d'HpFUR (20µM apo et 35µM substituée au Co(II)).....	- 274 -
Figure V.17 Métallation d'HpFUR par le cobalt entre 1 et 2 équivalents ajoutés.....	- 275 -
Figure V.18 Effet de l'EDTA sur la métallation d'HpFUR au cobalt suivi en UV-Visible.....	- 276 -

Figure V.19 A) Spectres CD enregistrés dans l'UV lointain d'Apo-HpFUR à 10µM (■) et d'Apo-EcFUR à 20µM (►). B) Spectre CD d'HpFUR enregistré dans l'UV proche.	- 277 -
Figure V.20 Effets du Co(II), Ni(II), Mn(II) et Zn(II) sur la structure secondaire d'HpFUR dimérique à 10µM.	- 278 -
Figure V.21 Simulation de l'état de métallation d'HpFUR, en considérant un modèle de liaison métallique simple 1métal:1monomère (site 2).	- 281 -
Figure V.22 Spectres CD enregistrés dans l'UV lointain d'Apo-HpFUR à 10µM (■), HpFUR à 10µM métallée avec 2 équivalents de Co(II) (▼), Holo-HpFUR (1.5eq Co(II)) concentrée puis diluée à 10µM (★).	- 282 -
Figure V.23 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR apo.	- 283 -
Figure V.24 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR apo et avec des équivalents de métal ajoutés.	- 283 -
Figure V.25 Evolution de la λ_{\max} d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR en fonction du métal (Zn(II) : ■ ; Ni(II) : ● ; Mn(II) : ▲ ; Co(II) : ▼) et du nombre d'équivalent ajouté par sous unité monomérique de protéine.	- 284 -
Figure V.26 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'Holo-HpFUR à 2,9µM (métallée dans le site 2 par 1,5 eq de Co(II) –suivi UV-Vis) (—), avec 5 eq de Co(II) (---), avec 15 eq de Co(II) (.....).....	- 285 -
Figure V.27 Liaison d'HpNikR et HpFUR sur la région intergénique au niveau des promoteurs de <i>pnikR</i> et <i>pexbB</i> (schéma inspiré de (Delany <i>et al.</i> , 2005)).	- 287 -
Figure V.28 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site <i>furS2</i> et <i>nikRS2</i> mesurée par un test de protection à la coupure par HinfI et SspI.	- 289 -
Figure V.29 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site <i>furS2</i> mesurée par un test de protection à la coupure par HinfI.	- 290 -
Figure V.30 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site <i>furS2</i> mesurée par un test de protection à la coupure par HinfI.	- 290 -
Figure V.31 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site <i>furS2</i> mesurée par un test de protection à la coupure par HinfI.	- 292 -
Figure V.32 Séquence consensus des UP éléments (Estrem <i>et al.</i> , 1998) comparée aux séquences du site OI (Delany <i>et al.</i> , 2003) et du site <i>furS2</i> (Delany <i>et al.</i> , 2005) liées par HpFUR.	- 296 -
Figure VI.1 Comparaison des structures d'EcNikR et d'HpNikR métallées au Ni(II) en présence ou en absence d'ADN.	- 302 -
Figure VI.2 Mécanismes hypothétiques généraux pour l'activation d'EcNikR et HpNikR : de l'acquisition du métal à la liaison à l'ADN.	- 310 -
Figure VI.3 Mécanisme d'activation d'HpFUR pour sa liaison sur la séquence intergénique <i>nikR-exbB</i>	- 313 -
Figure VII.1 Séquence d'ADN de la région intergénique introduite dans le plasmide pUC18 entre HindIII et BamHI, le plasmide a été nommé pIGR1.	- 323 -
Figure VII.2 Structure du PAR et complexe de liaison 2 PAR:1 M ²⁺ (McCall & Fierke, 2000)	- 330 -
Figure VII.3 Spectres d'absorption dans le visible des complexes Ni(II)-PAR à pH 8	- 331 -
Figure VII.4 Système Bio-Dot [®] microfiltration de BioRad	- 336 -
Figure VII.5 A) Molécule plane d'ANS. B) Spectres d'émission de l'ANS seul et en présence de protéine après excitation à 370nm.	- 338 -
Figure VII.6 Principe de l'anisotropie de fluorescence (PM : photomultiplicateur)	- 339 -
Figure VII.7 Principe du retard sur gel d'un complexe ADN/protéine par rapport à l'ADN seul. L'affinité de la protéine pour l'ADN peut-être déterminée lorsque 50% de l'ADN sont complexés et donc retardés... -	- 342 -
Figure VII.8 A) Représentation graphique de l'évolution du RF des marqueurs protéiques en fonction du pourcentage d'acrylamide. AE : Albumine de l'œuf, AB : Albumine bovine, α lac : α lactalbumine, CA :	

Anhydrase carbonique. B) Représentation graphique de la pente caractéristique en fonction du poids moléculaire des marqueurs protéiques, détermination de l'équation permettant de calculer le poids moléculaire des complexes à analyser.	343 -
Figure VII.9 Carte du plasmide pHP2S sur laquelle est précisée la zone d'insertion de la région intergénique entre les sites HindIII et BamHI ainsi que les sites de coupures des enzymes d'intérêts.	349 -
Figure C.1 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en absence de sel métallique dans le tampon de de migration.	366 -
Figure C.2 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en présence d'un excès de Ni(II) dans le tampon de de migration.	366 -
Figure C.3 Liaison d'HpNikR à l'ADN (<i>NiFu</i> _ <i>nikRS2</i>) en présence d'un excès de Mg(II) dans le tampon de de migration.	367 -

Liste des tableaux

Tableau I-1 Les différents facteurs σ présents chez <i>E.coli</i> . Les gènes transcrits et les motifs reconnus par ces facteurs sont présentés (Gruber & Gross, 2003; Ishihama, 2000; Wosten, 1998).	- 33 -
Tableau I-2 Les différentes familles de métallorégulateurs chez les bactéries.	- 36 -
Tableau I-3 Membres de la famille MerR (tous stimuli confondus)	- 37 -
Tableau I-4 Les régulateurs transcriptionnels de la famille MerR qui répondent au stimulus « ions métalliques »	- 37 -
Tableau I-5 Régions promotrices liées par les protéines MerR-like. Les régions-35 et -10 sont soulignées, les motifs symétriques sont en gras, le début de transcription lorsqu'il est connu est précisé par / (Brown <i>et al.</i> , 2003).	- 39 -
Tableau I-6 Caractéristiques de plusieurs membres de la famille SmtB/ArsR.	- 43 -
Tableau I-7 Comparaison du motif palindromique imparfait (12-2-12 inversé) lié par les membres de la famille SmtB/ArsR (Busenlehner <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2004; Liu <i>et al.</i> , 2005)	- 46 -
Tableau I-8 Caractéristiques de quelques membres de la famille DtxR.	- 48 -
Tableau I-9 Caractéristiques des certains membres de la famille FUR. Les modes de régulation sont définis par : 1 ^{ière} lettre R ou A pour Répression ou Activation _ 2 ^{nde} lettre D ou I pour Direct ou Indirect _ 3 ^{ème} lettre M ou A pour présence du cofacteur métallique ou non.	- 55 -
Tableau I-10 Liaison de métaux de transition par EcNikR, caractéristiques de la liaison (Constante de dissociation Kd, la longueur maximale de la bande de transfert de charge et le coefficient d'extinction molaire, technique employée pour le dosage par compétition (ND : non déterminé)) (Chivers & Sauer, 2002; Wang <i>et al.</i> , 2004).	- 71 -
Tableau I-11 Les autres sites à nickel observés lors du trempage des cristaux du complexe NikR-Ni-ADN dans une solution de Ni(II) (Schreiter <i>et al.</i> , 2006).	- 77 -
Tableau I-12 Constante de dissociation d'EcNikR métallée à l'ADN déterminée par diverses méthodes. A : Empreinte à la DNaseI, la protéine est incubée en présence d'1 équivalent de métal par monomère. B : EMSA, le gel et le tampon de migration contient 35 μ M du métal étudié (Bloom & Zamble, 2004) (NB : aucune liaison observée).	- 79 -
Tableau IV-1 Récapitulatif des techniques, des séquences et des principales conditions métalliques employées pour étudier la liaison d'HpNikR sur <i>pureA</i> et <i>pnixA</i> .	- 226 -
Tableau IV-2 Conditions expérimentales testées pour étudier la liaison à l'ADN d'HpNikR sur <i>NiFu</i> et <i>nikRS2</i> . Les croix correspondent aux conditions non testées. Le magnésium dans le tampon de complexation est utilisé pour saturer des sites aspécifiques sur l'ADN susceptible de lier du métal. Pour les conditions où seul du Mg(II) était présent en migration, la liaison n'a été testée que sur une séquence sinon la liaison a été sur les deux séquences.	- 235 -
Tableau V-1 La composition en acide-aminés d'HpFUR	- 258 -
Tableau V-2 Dosage par spectroscopie d'absorption atomique du contenu métallique d'HpFUR. La concentration protéique a été mesurée par spectroscopie d'absorption UV-Vis à 280nm.	- 272 -
Tableau VII-1 Taille des bandes obtenues après digestion par les enzymes de restriction en absence et en présence de protection de l'ADN par HpNikR et HpFUR.	- 350 -

Liste des Abréviations

Å :	Angström
ACT (domaine) :	Aspartate kinase-Chorismate mutase-TyrA (3 premières lettres de 3 enzymes ayant un tel domaine)
ADA :	Activation Directe de la transcription par la protéine Apo
ADM :	Activation Directe de la transcription en présence du cofacteur Métallique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AIM :	Activation Indirecte de la transcription en présence du cofacteur Métallique (<i>via</i> l'inhibition d'un partenaire intermédiaire)
AMPC :	Adénosine monophosphate cyclique
ANS :	8-Anilino-1-Naphtalène Sulfonate
ARN :	Acide ribonucléique
ARNs :	Petit acide ribonucléique régulateur anti-sens (ex : RyhB)
ATP :	Adénosine triphosphate
BA :	Basse Affinité (site)
BBP :	Bleu de bromophénol
BET :	Bromure d'Ethidium
Bmax :	Liaison maximale
BsPerR :	PerR de <i>Bacillus subtilis</i>
CD :	Circular Dichroism ou dichroïsme circulaire
CRP :	CAMP Receptor Protein noté aussi CAP
C-ter :	C-terminal
Da :	Dalton (unité)
dIdC :	polymère d'inosine et de cytosine
DLS :	Dynamic Light Scattering ou Diffusion dynamique de la lumière
DMA :	Dimethyl adipimidate
DNase I :	Deoxyribonuclease I
DTT :	Dithiothréitol
ϵ :	Coefficient d'extinction molaire (en $M^{-1}.cm^{-1}$)
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EcFUR :	Ferric Uptake Regulator d' <i>Escherichia coli</i>
EcNikR :	NikR d' <i>Escherichia coli</i>
EcNikR 3HA :	NikR d' <i>Escherichia coli</i> _ mutant His77/78/79 → Ala77/78/79
EcNikR H4 :	NikR d' <i>Escherichia coli</i> _ mutant His89 → Asn89

EcNikR Q2E :	NikR d' <i>Escherichia coli</i> _ mutant Gln2 → Glu2
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA :	Acide éthylène glycol tétraacétique
EMSA :	Electrophoretic Mobility Shift Assay
eq :	équivalent
ESI-TOF :	ElectroSpray Ionization-Time Of Flight
EXAFS :	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FBA :	Filter Binding Assay (Technique de liaison sur filtre)
Fl:	Fluorescéine
FPLC :	Fast Protein Liquid Chromatography
FT :	Facteur de Transcription
HA :	Haute Affinité (site HA)
H/D :	échange Hydrogène/Deutérium
HEPES :	Acide (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic
HpFUR :	Ferric Uptake Regulator d' <i>Helicobacter pylori</i>
HpNikR :	NikR d' <i>Helicobacter pylori</i>
HpNikR M1 :	NikR d' <i>Helicobacter pylori</i> _ mutant H99A-H101A-C107S
<i>H. pylori</i> :	<i>Helicobacter pylori</i>
ICBIC :	International Conference on Biological Inorganic Chemistry
ICT :	Inhibiteur de la chymotrypsine et de la trypsine
IPTG :	Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranoside
ITC :	Isothermal Titration Calorimetry ou Calorimétrie Isotherme à Titration
JBIC :	Journal of Biological Inorganic Chemistry
Kd :	Constante de dissociation
LMCT :	Ligand-Metal Charge Transfert
MOPS :	Acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
MtZUR :	Zinc Uptake Regulator de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ΔNt9-HpNikR :	NikR d' <i>Helicobacter pylori</i> dépourvue de son extension N-ter
NTA :	Acide nitrilotriacétique
N-ter :	N-terminal
PaFUR :	Ferric Uptake Regulator de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAR :	4-(2-pyridylazo) résorcinol
pb :	Paire de bases

PhNikR :	NikR de <i>Pyrococcus horikoshii</i>
pI :	point Isoélectrique
PM :	Poids moléculaire
PMSF :	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PVDF :	Polyvinylidene fluoride (membrane)
r :	anisotropie
RDA :	Répression Directe de la transcription par la protéine Apo
RDM :	Répression Directe de la transcription en présence du cofacteur Métallique
RF :	Rapport frontal
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE :	Résonance Paramagnétique Electronique
RX :	Rayon X
SDS :	Sodium DodécylSulfate
SDS-PAGE :	Sodium DodécylSulfate - Protein Analysis Gel Electrophoresis
TCA :	Acide trichloroacétique
TPP :	TétraPhénylPhosphonium ~ cofacteur de BmrR
TSP :	Transcription Start Point
Transporteur ABC :	Transporteur ATP-Binding Cassette
UP élément :	Upstream Promoteur element ou élément en amont du promoteur
UV-Vis:	Ultra Violet - Visible
vs :	<i>versus</i>
WT :	Wild-type (sauvage)
XANES :	X-ray Absorption Near Edge Structure
XAS :	X-ray Absorption Spectroscopy

Chapitre I
*La transcription
et les métallo-régulateurs
chez les procaryotes*

Deux classes d'ions métalliques sont distinguables dans le vivant. La première classe comprend des métaux « toxiques » tels que le mercure et le plomb. Ces métaux doivent être éliminés de l'organisme *via* des processus de détoxification ou transformés en matière moins nocive pour le vivant. La mise en place de tels processus nécessite la présence de protéines capables de détecter à basse concentration (10^{-21} à 10^{-12} M) ces métaux.

La seconde classe comprend des métaux de transition « essentiels » tels que le fer, le zinc, le cuivre et le nickel. Ils participent indirectement à de nombreux processus physiologiques en agissant soit en tant que cofacteur d'enzymes soit en facilitant le bon repliement des protéines. Ces métaux sont certes essentiels, toutefois leurs concentrations intracellulaires ne doivent pas dépasser un certain seuil au delà duquel ils seront toxiques pour l'organisme. Les bactéries régulent finement ces variations de concentration en contrôlant l'importation, l'exportation et le stockage des métaux. Le contrôle de ces fonctions passe par une régulation de l'expression génique particulièrement au niveau transcriptionnel par des protéines dites métallorégulatrices.

Cette introduction bibliographique sera constituée de plusieurs parties.

Dans un premier temps, je redéfinirai les fondements de la transcription (I.1 p- 30 -) chez les procaryotes avant de présenter les différentes familles de métallorégulateurs présentes chez les bactéries (I.2 p- 36 -). Une présentation des caractéristiques de ceux-ci sera faite en insistant entre autre sur les modes d'actions de ces régulateurs. Il est à noter que la lecture de cette partie n'est pas indispensable à la compréhension des résultats.

Dans un second temps, je présenterai les deux métallorégulateurs sur lesquels mes travaux se sont principalement portés : NikR d'*Escherichia coli* (I.3 p- 68 -) et NikR d'*Helicobacter pylori* (I.4 p- 88 -). Une présentation des données de la littérature actualisée sera faite. De nombreuses données ont été publiées en parallèle de mes travaux de thèse (cf. année des références bibliographiques). Ceci m'a d'ailleurs conduit à réorienter à plusieurs reprises mon travail.

I.1. La transcription chez les procaryotes

I.1.1. Généralités

Les bactéries produisent des milliers de protéines différentes qui sont indispensables pour les fonctions cellulaires ou pour l'adaptation à des changements environnementaux. Toutes ces protéines ne sont pas nécessaires en même temps ou dans les mêmes proportions. La régulation de l'expression des gènes est de ce fait nécessaire pour permettre à la bactérie de faire face « rapidement » à des changements mais aussi pour limiter la synthèse inutile de protéines. Les mécanismes de régulation mis en place affectent les deux étapes requises pour la synthèse d'une protéine : la transcription et la traduction. Seule la transcription sera abordée par la suite.

I.1.2. La transcription en quelques mots

La transcription d'un gène s'effectue en trois temps : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

L'initiation de la transcription comprend de nombreuses étapes ([Figure I.1](#)) (Wosten, 1998). La première, consiste en la liaison d'une enzyme, l'ARN polymérase couplée à un facteur σ , sur une séquence d'ADN spécifique reconnue comme étant un promoteur. Cette reconnaissance est permise par le facteur σ . La liaison du complexe actif au promoteur résulte dans la formation d'un complexe dit fermé qui est ensuite converti en complexe ouvert avec un dépliement de l'ADN à proximité du +1 de transcription. Une transcription abortive est alors initiée (formation de petits ARN de 2 à 12 pb), le complexe ternaire formé reste au niveau de la région promotrice. L'initiation de la transcription est limitée par la difficulté à former des complexes ouverts. Le facteur σ se dissocie ensuite de l'enzyme, cette dernière perd alors son affinité et sa spécificité pour le promoteur. La transcription débute alors, c'est l'étape d'élongation caractérisée par la synthèse de l'ARN messager. L'élongation de l'ARN se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$. La transcription de l'ARN se poursuit jusqu'à la rencontre d'un motif de terminaison par l'enzyme. Cette dernière se dissocie alors de l'ADN et l'ARNm est libéré.

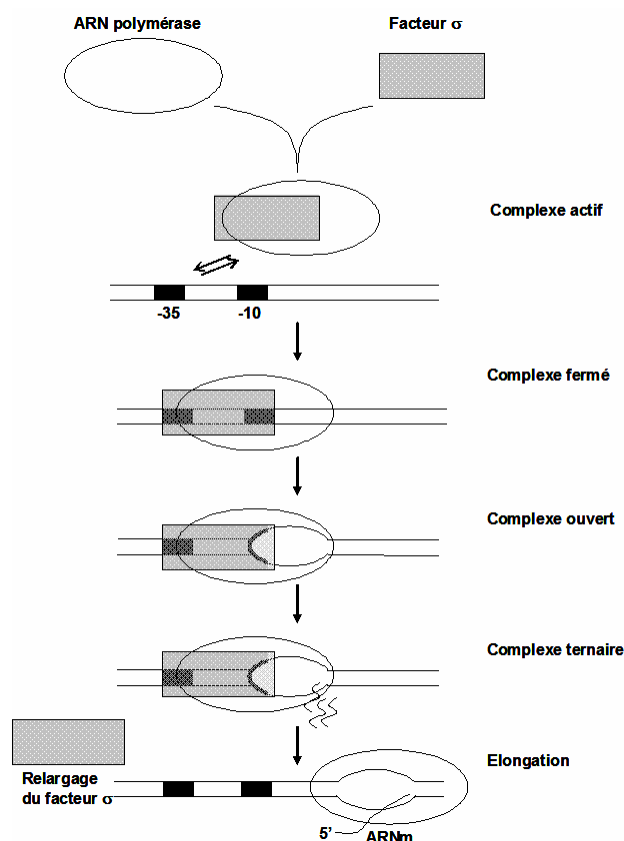


Figure I.1 Représentation schématique des différentes étapes de l'initiation de la transcription avec l'ARN polymérase associée à son facteur σ . L'enzyme activée (complexe actif) se lie au promoteur pour former un complexe fermé. Des changements conformationnels de ce dernier ont lieu permettant l'ouverture dans la région -10 du promoteur. Dans cet état l'enzyme commence la transcription en formant des ARN abortifs, un complexe ternaire est formé. Ensuite le facteur σ se dissocie et l'enzyme débute l'élongation de l'ARNm (Wosten, 1998).

I.1.3. La régulation de la transcription

La transcription constitue un niveau de contrôle essentiel dans la régulation de l'expression génique. Les mécanismes mis en jeu font intervenir dans un premier temps l'ARN polymérase et le facteur sigma qui sont les partenaires de la transcription ainsi que des partenaires extérieurs : « des régulateurs de la transcription » qui peuvent réprimer ou alors activer cette dernière.

I.1.3.1. Régulation par l'ARN polymérase et les facteurs sigma

L'initiation de la transcription est dépendante de l'ARN polymérase (ARNpol) et du facteur sigma.

Il n'existe qu'une ARNpol chez les procaryotes contrairement aux eucaryotes. Cette enzyme comprend différentes sous-unités : 2 unités α , 1 unité β , 1 unité β' et 1 unité ω qui servirait de chaperonne pour l'unité β' (Figure I.2) (Browning & Busby, 2004).

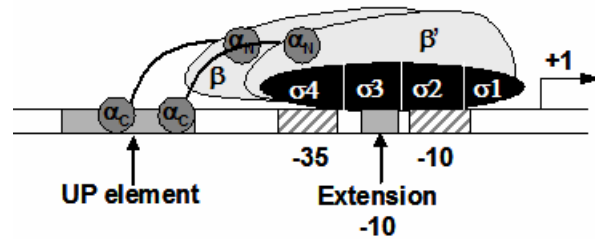


Figure I.2 Machinerie de transcription chez les procaryotes avec l'ARN polymérase associée au facteur σ positionnée sur les régions -35 et -10 du promoteur d'un gène. La flèche indique le début et le sens de la transcription. Le facteur σ permet, avec ses régions 4 et 2, la reconnaissance des régions -35 et -10 du promoteur. La région 3 est impliquée dans la reconnaissance d'extension de la région -10. Le domaine N-ter de la sous-unité α (α_N) interagit avec le corps de l'enzyme constitué des unités β et β' . Le domaine C-ter de la sous-unité α (α_C) interagit ici avec une région en amont du promoteur (UP element) plus précisément en amont du motif -35 (séquence riche en A/T). La contribution des différents éléments (-10 ; -35 ; extension -10 ; et UP element) du promoteur fluctue d'un promoteur à l'autre (Browning & Busby, 2004).

Cet ensemble constitue le cœur de l'enzyme c'est-à-dire la machinerie qui permet la synthèse de l'ARN à partir de l'ADN. Cependant cet ensemble ne peut initier la transcription de gène seul. Cette enzyme présente une haute affinité pour l'ADN mais aucune spécificité. Sa spécificité provient de sa liaison avec une sous-unité supplémentaire appelé facteur σ . Leur association induit des changements conformationnels qui tend à diminuer l'affinité du « complexe actif » pour l'ADN. Les facteurs σ s'associent de façon réversible au cœur de l'enzyme pour former le « complexe actif » capable d'initier une transcription spécifique. Ces facteurs permettent à l'enzyme de reconnaître spécifiquement des régions d'ADN, les promoteurs des gènes et de s'y lier. Les facteurs σ reconnaissent deux séquences conservées dans la région promotrice : un motif en -10 (boîte de Pribnow) et un motif en -35 par rapport au site d'initiation de la transcription. L'espacement entre ces deux motifs est important pour le bon positionnement de l'enzyme et l'initiation de la transcription.

Plusieurs facteurs σ sont synthétisés par les bactéries ([Tableau I-1](#)). Ils sont capables de reconnaître spécifiquement des motifs et donc de permettre la distinction entre différentes classes de promoteurs.

Ces différents facteurs σ permettent à la bactérie de maintenir une expression basale de gènes ainsi que de réguler l'expression de certains autres gènes en réponse à un stimulus environnemental particulier. Par exemple le facteur σ^{19} permet la transcription des gènes du système de transport Fec chez *E.coli* après une activation indirecte conduite par le citrate de fer (Gruber & Gross, 2003).

Facteur σ	Nom du gène	Stimulus // Système transcrit Régulon	Motifs consensus reconnus
σ^{70}	<i>rpoD</i>	~1000 gènes // Fonctions basales	-35 -10 TTGACA -17pb-TATAAT
σ^S	<i>rpoS</i>	~100 gènes // Entrée en phase stationnaire / réponse à un stress (force ionique / pH)	courbure -----CTATACT
σ^{32}	<i>rpoH</i>	~40 gènes // Choc thermique	CCCTTGAA -14pb-CCCGATnT
σ^{24}	<i>rpoE</i>	Protéines dénaturées à la membrane externe	ATTGAACTT -16pb-TCTGAT
σ^{28}	<i>rpoF</i>	~40 gènes // Chemotaxie // Synthèse de flagelle	TAAAGTX - 11pb-GCCGATAA
σ^{19}	<i>fecI</i>	Appauvrissement en fer et présence de complexe ferric-citrate // Transcription de l'opéron fecABCDE	AAGGAAAAT - 17pb-TCCTTT
σ^{54}	<i>rpoN</i>	~15 gènes // Métabolisme de l'azote	-24 -12 CTGnA -6pb-TTGCA

Tableau I-1 Les différents facteurs σ présents chez *E.coli*. Les gènes transcrits et les motifs reconnus par ces facteurs sont présentés (Gruber & Gross, 2003; Ishihama, 2000; Wosten, 1998).

Chez les bactéries, au moins 14 classes de facteurs σ ont été identifiées, et sont assimilées soit à la famille des facteurs σ^{70} , soit à la famille des facteurs σ^{54} . Cette seconde famille utilise des mécanismes particuliers pour assurer la formation du complexe ouvert (besoin d'un activateur et d'ATP) à la différence de la famille des facteurs σ^{70} .

Chez *E.coli*, au moins 6 facteurs de la famille σ^{70} (σ^{70} σ^S σ^{32} σ^{24} σ^{28} σ^{19}) ont été identifiés ainsi qu'un facteur σ^{54} (Gruber & Gross, 2003; Ishihama, 2000; Sadhale *et al.*, 2007; Wosten, 1998), alors que chez *H. pylori*, seuls trois facteurs sigma ont été identifiés jusqu'à présent : σ^{80} (RpoD), σ^{54} (RpoN) et σ^{28} (FliA) (Scarlatto *et al.*, 2001). La différence de composition en facteur σ chez les micro-organismes suggère que ceux-ci utilisent des mécanismes différents pour répondre à un stress.

I.1.3.2. *La régulation par des facteurs supplémentaires*

La transcription des gènes dépend certes de l'ARN polymérase et des facteurs σ (reflet de l'état de la bactérie : stress, phase stationnaire...) mais également de facteurs qui vont la moduler.

Parmi ces facteurs, on dénote la présence de protéines qui modulent l'activité des facteurs σ indépendamment de leur synthèse (transcription/traduction) en interagissant spécifiquement avec certains facteurs σ (Ishihama, 2000; Wosten, 1998). Ces protéines sont des facteurs anti-sigma. De nombreux facteurs anti-sigma séquestrent leur facteur σ cible afin que ce dernier ne puisse se lier à l'ARN polymérase. Ils agissent comme des inhibiteurs de l'activité. Ils permettent à la bactérie de répondre de façon appropriée aux *stimuli* de l'environnement. La liaison au facteur σ a lieu jusqu'à ce qu'il soit requis pour une transcription donnée de gènes.

Il existe d'autres facteurs de modulation de la transcription qui vont également permettre à la bactérie de répondre aux stimuli *via* des mécanismes différents. Ce sont ces facteurs qui vont plus particulièrement nous intéresser dans ce travail. Ils peuvent agir soit comme répresseur soit comme activateur de la transcription (Browning & Busby, 2004; Ishihama, 2000; Wosten, 1998). Seuls les mécanismes simples de régulation sont présentés.

La répression de la transcription peut être expliquée par trois mécanismes (Figure I.3) :

- Le premier modèle implique une gêne stérique au cours de laquelle une liaison du facteur de transcription sur une séquence opératrice qui chevauche les motifs -35 et/ou -10 du promoteur a lieu.
- Le second modèle implique une torsion de l'ADN due à l'interaction entre deux répresseurs.
- Le troisième modèle implique une modulation de l'activité d'un facteur de transcription activateur sur un promoteur donné.

Ces régulateurs dits de répression empêchent totalement ou partiellement un bon positionnement de l'enzyme ou modifient la courbure de l'ADN, ce qui réprime la transcription.

L'activation de la transcription, quant à elle, nécessite l'association de la protéine activatrice au complexe enzymatique. Cette protéine est requise soit pour le recrutement initial de l'enzyme, soit pour faciliter la conversion du complexe fermé en complexe ouvert, soit pour l'accessibilité au promoteur (espacement entre les motifs). Deux modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes d'activation « simple » de ces protéines (Figure I.3) (Browning & Busby, 2004; Rhodius & Busby, 1998) :

- Soit un contact direct est réalisé avec le complexe enzymatique : interaction avec le domaine C terminal de la sous unité α (Classe I) et/ou interaction avec la région 4 du facteur σ (Classe II).
- Soit aucun contact n'est établi entre les deux partenaires, la protéine modifie la conformation du promoteur. Un alignement des régions -10/-35 peut avoir lieu, ce qui facilite le positionnement de l'enzyme et l'initiation de la transcription.

Généralement ces activateurs lient l'ADN sur des régions en amont du promoteur (régions -30 -90 par rapport au site initial de transcription). Le motif -35 de ces promoteurs présente souvent peu d'homologie avec le motif -35 consensus du facteur sigma requis (Wosten, 1998).

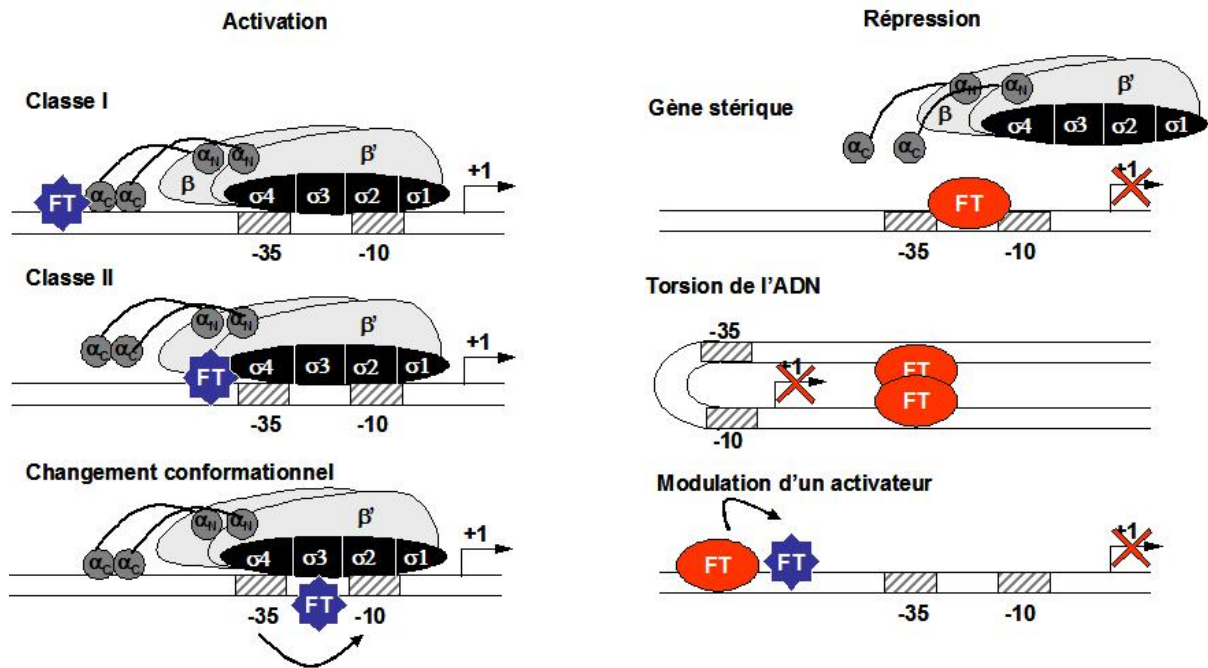


Figure I.3 Quelques mécanismes de régulation de la transcription par des facteurs de transcription (FT). Activation soit par contact direct du FT avec le domaine α_C de l'ARN polymérase ou avec le domaine 4 du facteur σ (dans certains cas des contacts directs peuvent être établis entre α_N -FT et σ_4) soit en absence de contact entre l'enzyme et le FT, celui-ci induit des changements dans l'orientation des régions -35 et -10 du promoteur. Répression soit par liaison directe du FT sur le promoteur (gène stérique), soit par formation de boucle, soit par une modulation de l'activité du FT activateur par un FT répresseur (Browning & Busby, 2004).

Un même facteur de transcription peut agir soit comme un répresseur soit comme un activateur selon le promoteur impliqué et le positionnement des séquences reconnues et liées (Ishihama, 2000).

L'activité propre des facteurs de transcription est modulée soit par des ligands (métal), soit par des modifications covalentes (phosphorylation), soit par d'autres facteurs de transcription, soit par séquestration *via* des protéines dites de régulation.

Parmi les facteurs de transcriptions présents chez les bactéries se trouvent les métallorégulateurs dont la fonction est de réguler l'expression de gènes en réponse à un métal. Les caractéristiques de ces derniers vont être présentées maintenant.

I.2. Les métallorégulateurs chez les procaryotes

L'homéostasie des métaux chez les procaryotes est réalisée par des protéines métallorégulatrices qui agissent au niveau transcriptionnel. Les gènes régulés codent principalement pour des protéines responsables de la détoxification des métaux, le stockage, l'importation et l'exportation de ceux-ci.

Cinq familles de métallorégulateurs ont été clairement identifiées à ce jour à partir des analyses de séquences et sont listées dans le Tableau I-2. Une sixième famille de métallorégulateurs a dernièrement été suggérée. RcnR, son unique membre, sera brièvement présenté dans le cadre de l'homéostasie du nickel chez *E. coli* (Iwig *et al.*, 2006). Chaque famille est nommée en fonction du nom du premier membre caractérisé.

Famille	Régulateurs	Ion métallique reconnu	Fonctions	Renvoi
MerR	MerR	Hg(II)	Résistance au Hg(II)	I.2.1
	CueR	Cu(I), Ag(I), Au(I)	Résistance au Cu(I)	
SmtB/ArsR	SmtB	Zn(II)	Homéostasie du Zn(II)	I.2.2
	ArsR	As(III), Sb(III)	Résistance au As(III)	
DtxR	DtxR	Fe(II)	Homéostasie du Fe(II)	I.2.3
	MntR	Mn(II)	Homéostasie du Mn(II)	
FUR	FUR	Fe(II)	Homéostasie du Fe(II)	I.2.4
	PerR	Fe(II), Mn(II)	Lutte contre le stress oxydant	
	Zur	Zn(II)	Homéostasie du Zn(II)	
NikR	NikR	Ni(II)	Homéostasie du Ni(II)	I.2.5
RcnR (?)	RcnR	Ni(II)	Homéostasie du Ni(II)	I.3.5

Tableau I-2 Les différentes familles de métallorégulateurs chez les bactéries

Ces régulateurs répondent à différents ions métalliques et les modifications induites par la liaison ou non du cofacteur sur les régulateurs influencent leurs fonctions. Les caractéristiques structurales, les mécanismes d'activation et les modes de régulation de ces différentes classes de régulateurs en lien avec l'homéostasie des métaux vont être présentés.

Différents travaux ont été utilisés afin de faire cette présentation générale des métallorégulateurs (Brown *et al.*, 2003; Busenlehner *et al.*, 2003; Dosanjh & Michel, 2006; Lee & Helmann, 2007; Pecqueur, 2005; Pennella & Giedroc, 2005).

I.2.1. La famille des régulateurs MerR

I.2.1.1. Généralités

La famille MerR est composée de régulateurs transcriptionnels homodimériques. Ces derniers lient l'ADN et peuvent selon les conditions environnementales activer ou réprimer la transcription de gènes.

Les membres de cette famille répondent à différents *stimuli* environnementaux comme le stress oxydant, les antibiotiques/drogues ou encore les métaux (Brown *et al.*, 2003; Pennella & Giedroc, 2005).

Régulateur	Stimulus	Protéine dont l'expression est régulée	Références
SoxR	Stress oxydant	SoxS	(Amabile-Cuevas & Demple, 1991; Fuentes <i>et al.</i> , 2001; Hidalgo <i>et al.</i> , 1998)
BmrR	Composé lipophile - Rhodamine 6G - Tétraphénylphosphonium (TPP)	Bmr (assure le transport de drogues)	(Ahmed <i>et al.</i> , 1995; Heldwein & Brennan, 2001)
MerR	Hg ²⁺	Protéines de l'opéron <i>mer</i> responsable de la résistance au Hg ²⁺	(Ansari <i>et al.</i> , 1995; Summers, 1992)

Tableau I-3 Membres de la famille MerR (tous *stimuli* confondus)

La sous-famille répondant au stress métallique peut être divisée en sous-groupe en fonction du métal activateur (Brown *et al.*, 2003; Checa *et al.*, 2007; Hobman, 2007).

Régulateur transcriptionnel	Métal activateur
MerR	Hg ²⁺
CueR / SctR	Cu ⁺
ZntR / PmtR	Zn ²⁺
CadR	Cd ²⁺
CoaR (CorR)	Co ²⁺
PbrR	Pb ²⁺
GolS	Au ⁺

Tableau I-4 Les régulateurs transcriptionnels de la famille MerR qui répondent au stimulus « ions métalliques »

Certains métallorégulateurs, tels que MerR, PbrR ou encore GolS, sont uniquement activables par un type d'ion métallique : le mercure, le plomb et l'or respectivement. D'autres répondent à des classes d'ions métalliques *in vivo* (Hobman *et al.*, 2005), c'est le cas de ZntR qui est activable par le zinc, le cadmium ainsi que le plomb (Binet & Poole, 2000) ou encore CueR qui est activable par le cuivre, l'argent et l'or (Outten *et al.*, 2000; Stoyanov *et al.*, 2001; Stoyanov & Brown, 2003). La sélectivité métallique des membres de la famille MerR dépend

des métaux liés (degré d'oxydation +1/+2), de la coordination du site et de la nature des ligands (au minimum 2 cystéines conservées) (Hobman *et al.*, 2005; Pennella & Giedroc, 2005).

I.2.1.2. Caractéristiques structurales des membres de la famille MerR

Bien que MerR soit le premier membre de cette famille à avoir été étudié, sa structure n'a pas encore été résolue, contrairement à celle de BmrR (Heldwein & Brennan, 2001; Newberry & Brennan, 2004) et celle de MtaN (Godsey *et al.*, 2001; Newberry & Brennan, 2004) (une forme mutée du régulateur Mta). Ces deux premières études ont permis de définir les fondements structuraux des membres de la famille MerR ainsi que de donner un aperçu du mécanisme de liaison à l'ADN. En 2003, les structures de CueR (Changela *et al.*, 2003) et de ZntR ont été résolues.

Ces protéines qui sont des homodimères comprennent trois domaines (Figure I.4) :

- Un domaine de liaison à l'ADN avec un motif hélice-coude-hélice ailé situé à l'extrémité N-ter de chaque monomère. Ce domaine est bien conservé entre les différents membres de la famille MerR (Brown *et al.*, 2003; Heldwein & Brennan, 2001).

Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ interagissent avec l'ADN au niveau de deux grands sillons et constituent le motif hélice-coude-hélice. Les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ forment le premier motif dit « ailé ». Les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ constituent un second motif ailé apparent.

- Un domaine de jonction constitué de deux hélices antiparallèles entrelacées (coiled-coil) permettant la dimérisation des deux monomères. Il joint le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation
- Un domaine d'activation permettant la liaison de métal ou d'autres cofacteurs

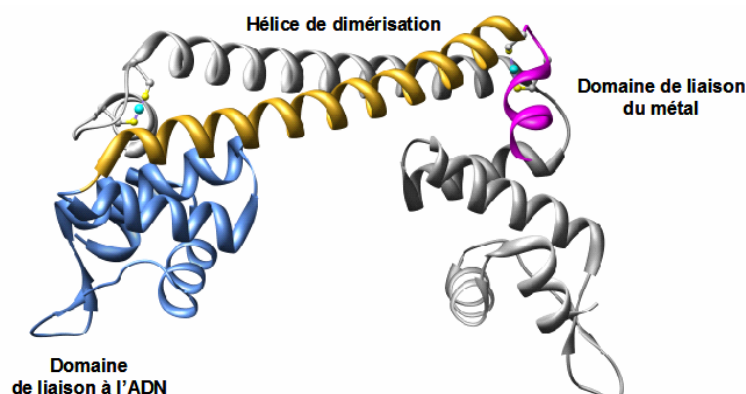


Figure I.4 Structure tridimensionnelle de Cu(I)-CueR de résolution 2.2 Å (Changela *et al.*, 2003). CueR est un dimère, une des unités monomériques le constituant est grisée. La structure comprend trois domaines : le domaine de liaison à l'ADN (en bleu) avec le motif hélice-coude-hélice ailé, le domaine de jonction (en jaune) permettant la dimérisation, le domaine d'activation (en violet). Ce domaine chez CueR lie le Cu(I) (sphère en cyan) avec les cystéines 112 et 120.

I.2.1.3. Mécanisme d'action général

Les membres de la famille MerR régulent la transcription de gènes dont les promoteurs, qui sont facteur σ^{70} dépendant, ont un espacement particulier entre les régions -10 et -35 (Tableau I-5). Généralement les promoteurs dépendant du facteur σ^{70} ont un espacement de 17 ± 1 pb entre les régions -10 et -35. Les promoteurs concernés par une régulation *via* les MerR-like ont entre les deux motifs un espacement de 19-20 pb.

La différence d'orientation des deux régions, dont l'espacement varie de 17 et 19 pb, est une translation de 6.8 Å ainsi qu'une rotation de 72° autour de l'axe de l'hélice (Brown *et al.*, 2003).

Promoter	Metal	Regulator	Sequence ^a	Spacer (bp)
Tn501/Tn21 <i>mer</i>	Hg	MerR	CGCTTGACTCCGTACATGAGTACGGAACTAAGGTTACGCT/ATCCA	19
<i>Bacillus mer</i>	Hg	MerR	ATAATTACCTGTACTAAGGTACGTGGTTATGCTGTAAGTGAGG	20
<i>Staphylococcus mer</i>	Hg	MerR	GACTTGACCGTGACTATGGTACAGGGTTATACTTTTATTGAG	20
<i>E. coli zntA</i>	Zn	ZntR	AACCTGACTCTGGAGTCGACTCCAGAGTGTATCCTTCGGTT/AATG	20
<i>E. coli copA</i>	Cu	CueR	TTCTTGACCCTCCCTTGCTGGAAGGTTAACCCTTATCAC/AGCC	19
<i>E. coli cueO</i>	Cu	CueR	GGCTTGACCCTCCCTAAGGGAAGGACTATGCTCAACGTTTGAT	19
<i>Synechocystis coaT</i>	Co	CoaR	ACCTTGACTTGACACTAATGTTAAGGTTAGGCTGAGAAGGTAA	20
<i>Ralstonia pbrA</i>	Pb	PbrR	GTCTTGACTCTATAGTAAGTAGAGGGTTAAATCGGCA/CGCGA	19
<i>Pseudomonas cadA</i>	Cd	CadR	GGCTTGACCCTATAGTGGCTACAGGGTGTTCACCTGGCAACAGGC	19/20 ^b
<i>E. coli soxS</i>	–	SoxR	CGCTTTACCTCAAGTTAACTTGAGGAATTATACTCCCCAAC/AGAT	19
<i>S. lividans tipA</i>	–	TipA _L	GGCTTGACCTCTCACGTACGTTGAGGAGGAGCGTGGACGGC/GTCA	19
<i>Bacillus bmr</i>	–	BmrR	CCGTTGACTCTCCCTAGGAGGAGGCTTACAGTATAAGGGATAC	19

Tableau I-5 Régions promotrices liées par les protéines MerR-like. Les régions-35 et -10 sont soulignées, les motifs symétriques sont en gras, le début de transcription lorsqu'il est connu est précisé par / (Brown *et al.*, 2003)

La résolution à 3 et 2.7 Å des structures des complexes BmrR-TPP-ADN (TPP ~ cofacteur) (Figure I.5) et MntA-ADN respectivement a permis d'expliciter le mécanisme de liaison et d'activation des membres de la famille MerR à l'ADN (Heldwein & Brennan, 2001; Newberry & Brennan, 2004).

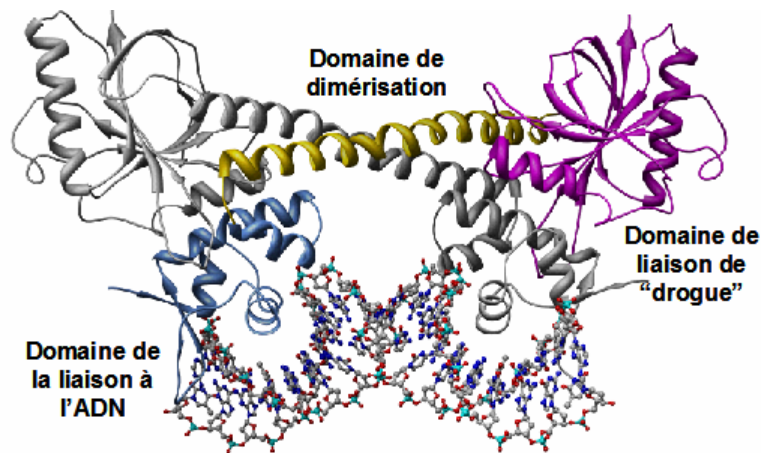


Figure I.5 Structure tridimensionnelle du complexe BmrR-TPP-ADN de résolution 3 Å (Heldwein & Brennan, 2001). Le domaine de liaison à l'ADN est en bleu, le domaine de jonction est en jaune et le domaine d'activation est en violet.

Un mécanisme d'action général des métallorégulateurs de la famille MerR a été proposé (Figure I.6).

En absence d'activateur, le régulateur est lié à l'ADN sur une dyade symétrique entre les régions -10 et -35 (Tableau I-5). La courbure de l'ADN étant augmentée, les deux motifs du promoteur ne sont plus en phase. Le complexe de transcription (ARN polymérase et facteur sigma) ne peut s'y fixer correctement et donc initier la transcription des gènes.

L'activation par le cofacteur entraîne une rotation des domaines de liaison à l'ADN autour d'un axe formé par le domaine de jonction (coiled-coil). Cette rotation entraîne une torsion de l'ADN qui permet de mettre en phase les régions -35 et -10 du promoteur. L'ARN polymérase peut se fixer correctement sur son promoteur et donc initier la transcription.

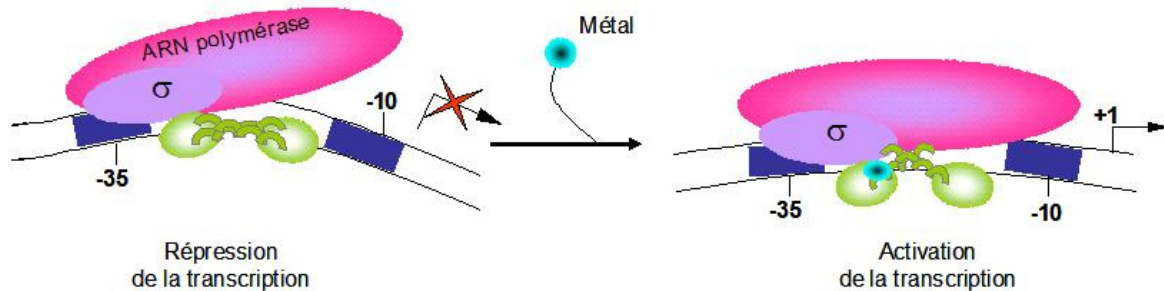


Figure I.6 Mécanisme d'action des métallorégulateurs de la famille MerR. En absence de métal, le métallorégulateur empêche la transcription des gènes. En présence de métal, le métallorégulateur favorise la transcription des gènes par distorsion de l'ADN. Schéma inspiré du mécanisme d'action de MerR sur son promoteur proposé dans : (Brown *et al.*, 2003; Hobman, 2007).

I.2.1.4. MerR et la résistance au Hg(II)

I.2.1.4.1. MerR, sa fonction

Le gène codant pour MerR a été identifié au début des années 80 au niveau de deux transposons, le Tn501 de *Pseudomonas aeruginosa* (Stanisich *et al.*, 1977) et le Tn21 du plasmide R100 de *Shigella flexneri* (Barrineau *et al.*, 1984).

MerR régule la transcription de l'opéron *mer* (Figure I.7) qui code, au minimum, pour quatre protéines MerT, MerP, MerA et MerD. Elle contrôle également sa propre expression transcriptionnelle, le gène est transcrit de façon divergente à l'opéron *mer* (Brown *et al.*, 2003).

MerT est un transporteur de la membrane interne (3 segments transmembranaires). Selon l'opéron considéré, le transporteur MerC (4 segments transmembranaires) ou MerF (2 segments transmembranaires) peut également être exprimé (Silver & Phung le, 2005).

MerP est une protéine périplasmique. MerA est une réductase cytoplasmique à Hg(II). Elle réduit le Hg(II) en Hg(0) qui est volatile et donc moins toxique pour le micro-organisme qui l'évacue.

MerD est un co-régulateur de l'opéron *mer* impliqué dans la modulation de l'activité de MerR par décrochage de cette dernière de l'ADN en absence de mercure (Champier *et al.*, 2004). Ces différentes protéines confèrent une résistance au Hg(II) à la bactérie.

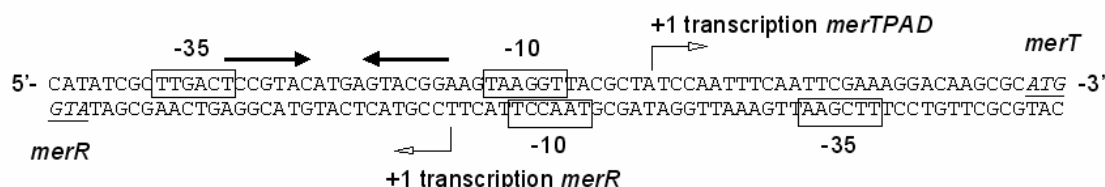


Figure I.7 Organisation de la région intergénique : *merR* – *merTPAD* du transposon Tn501 (Brown *et al.*, 2003; Hobman *et al.*, 2005). Les boîtes -10 et -35 des deux promoteurs sont encadrées. Les +1 de transcription (Transcription Start Point ou TSP) sont indiqués avec les flèches ouvertes. Le motif palindromique lié par MerR est précisé avec les flèches pleines.

MerR reconnaît un motif original (Tableau I-5 et Figure I.7) pour se lier à l'ADN. Elle présente une forte affinité pour l'ADN en absence de métal ($K_d \sim 140$ pM (O'Halloran *et al.*, 1989) ; $K_d \sim 2$ nM (Champier *et al.*, 2004)), cette affinité tend à décroître en présence de mercure ($K_d \sim 420$ pM (O'Halloran *et al.*, 1989) ; $K_d \sim 17$ nM (Champier *et al.*, 2004)). De plus, MerR présente une affinité très élevée pour le mercure (K_d app : 10^{-7} M en présence de 10^{-3} M de thiols exogènes (Shewchuk *et al.*, 1989b)).

En dépit du fait que MerR possède deux sites potentiels de métallation au Hg^{2+} , *in vitro* et en absence d'ADN, seule la métallation d'un site a pu être observée (Shewchuk *et al.*, 1989a; Shewchuk *et al.*, 1989b; Zeng *et al.*, 1998). Cette liaison induit des changements conformationnels de la protéine qui rendraient le second site de métallation inaccessible. Le mercure est coordonné par trois cystéines : C82 (monomère 1), C117' et C126' (monomère 2), une géométrie de type trigonal est observée.

I.2.1.4.2. La résistance au Hg^{2+}

Les bactéries, ayant l'opéron *mer*, peuvent faire face à des stress Hg(II) associés à leur environnement. Cinq étapes sont observées (Figure I.8). En absence de mercure, l'ARN polymérase se lie sur le promoteur *pmerR* et assure la transcription du gène *merR* (Figure I.8A). La protéine MerR, qui en résulte, se lie à l'ADN et recouvre en partie le promoteur *pmerT*. Le positionnement du régulateur d'une part accentue la courbure de l'ADN et d'autre part permet le « recrutement » de l'ARN polymérase (Figure I.8B). MerR interagit avec les sous-unités α , β et σ de l'ARN polymérase (Kulkarni & Summers, 1999). Elle réprime la

transcription de l'opéron *mer* et de son gène. En présence de Hg(II), MerR le lie ce qui provoque des changements conformationnels de cette dernière et permet une distorsion de l'ADN ainsi qu'un réalignement du promoteur *pmer* (Figure I.8C). L'ARN polymérase se repositionne avant d'initier la transcription de l'opéron. Les protéines MerT, P, A et D sont synthétisées.

Une cascade est ensuite mise en jeu (Hobman *et al.*, 2005; Silver & Phung le, 2005) afin de piéger le mercure pour le réduire en Hg(0) volatile (Figure I.8D). Une fois le stress mercurique maîtrisé, la synthèse de l'opéron *mer* doit être régulée. Cette régulation semble être réalisée par MerD, elle s'associe à MerR-Hg(II) pour former un complexe ternaire « MerD-MerR-pmerT » (Champier *et al.*, 2004). Ce complexe déstabilise l'interaction entre MerR et *pmerT* pour permettre la synthèse de nouvelle protéine MerR apo.

Le mécanisme d'action de MerR est en accord avec les structures qui ont été résolues pour BmrR, Cu-CueR et ZntR.

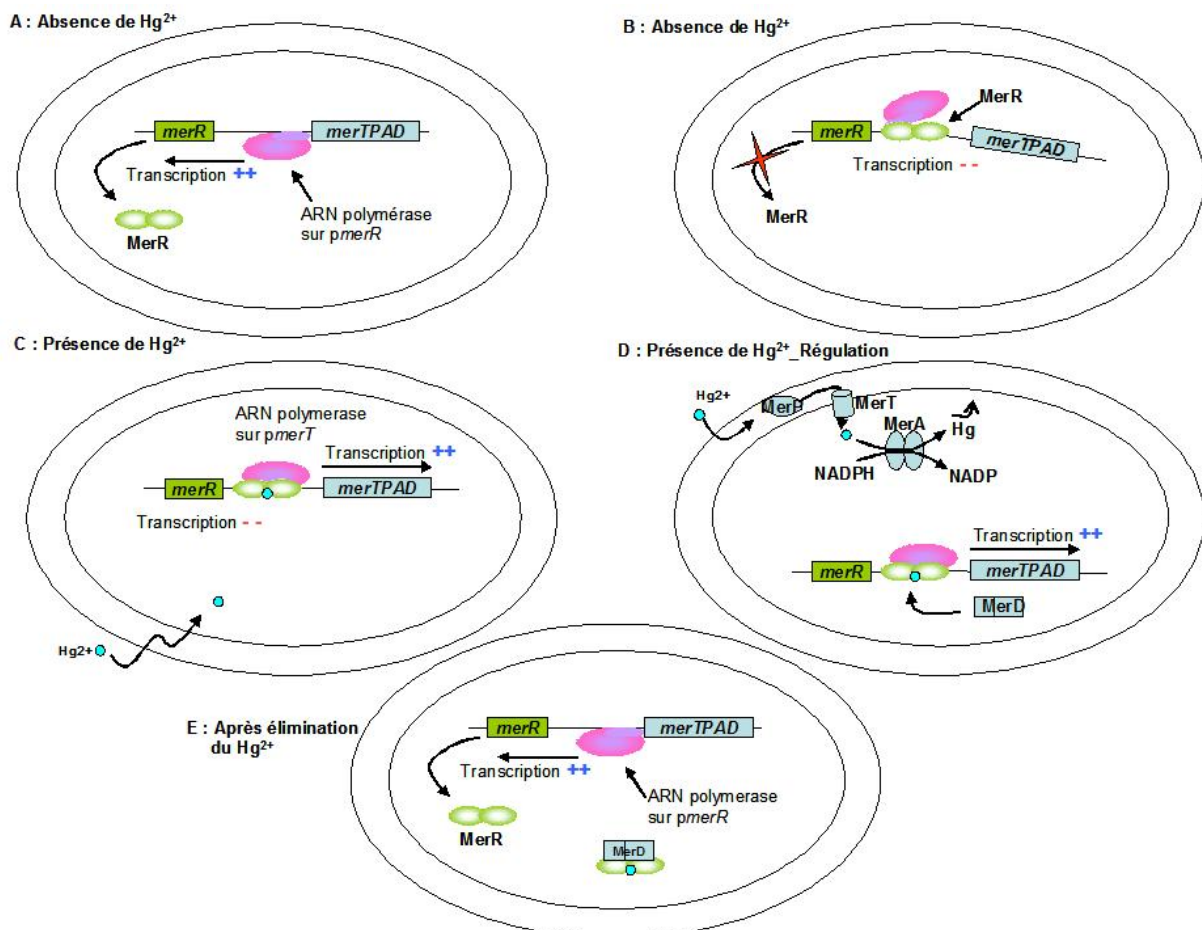


Figure I.8 Représentation schématique (inspiré de Hobman *et al.* (2005)) de la régulation du stress « mercure » chez *E. coli* ayant l'opéron *mer* du transposon Tn501.

I.2.2. La famille des régulateurs SmtB/ArsR

I.2.2.1. Généralités

La famille SmtB/ArsR, qui doit son nom à SmtB de *Synechococcus* PCC 7942 (Morby *et al.*, 1993) et à ArsR de *E.coli* (Wu & Rosen, 1991; Wu & Rosen, 1993), est constituée de régulateurs transcriptionnels homodimériques qui répondent uniquement au stress métallique. Ces régulateurs, qualifiés de répresseurs, lient l'ADN en absence de métal. La liaison d'un métal entraîne des changements conformationnels du régulateur induisant une dissociation des complexes ADN/Protéine. La transcription est de ce fait déréprimée. Les membres de cette famille de régulateurs ont des affinités pour les métaux allant de 10^8 à 10^{13} M^{-1} (Busenlehner *et al.*, 2003).

Les caractéristiques de différents membres de cette famille sont décrites dans le Tableau I-6.

Répresseur	Métal activateur	Protéine régulée (fonction)	Sites métalliques	Site de Régulation	Références
SmtB	Zn(II) ; Co(II) ; Cd(II)	SmtA (Métallothionéine de classe II)	$\alpha 3N$, $\alpha 5$	$\alpha 5$	(Erbe <i>et al.</i> , 1995; Kar <i>et al.</i> , 1997; VanZile <i>et al.</i> , 2002a; VanZile <i>et al.</i> , 2002b)
CzrA	Zn(II) ; Co(II)	CzrB (Transporteur de cations par diffusion)	$\alpha 5$	$\alpha 5$	(Eicken <i>et al.</i> , 2003)
NmtR	Ni(II) ; Co(II)	NmtA (ATPase)	$\alpha 5C$	$\alpha 5C$	(Cavet <i>et al.</i> , 2002)
CadC	Cd(II) ; Pb(II) ; Bi(II) ; Zn(II)	CadA (ATPase de type P1b)	$\alpha 3N$, $\alpha 5$	$\alpha 3N$	(Busenlehner <i>et al.</i> , 2002a; Busenlehner <i>et al.</i> , 2002b; Endo & Silver, 1995)
ArsR	As(III) ; Sb(III)	ArsA (ATPase) ArsB (Transporteur) ArsC (arsenate réductase)	$\alpha 3$	$\alpha 3$	(Wu & Rosen, 1991; Wu & Rosen, 1993)
AztR	Zn(II) ; Pb(II) ; Cd(II)	AztA (CPx-ATPase)	$\alpha 3N$	$\alpha 3N$	(Liu <i>et al.</i> , 2005)
CmtR	Cd(II) ; Pb(II)	CmtA (ATPase de type P1)	Site original	Site original 3 cystéines	(Cavet <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2005)

Tableau I-6 Caractéristiques de plusieurs membres de la famille SmtB/ArsR

I.2.2.2. Sites métalliques

Deux types de sites métalliques (exception faite de ceux de CmtR qui sont atypiques (Cavet *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005)) ont été identifiés dans la famille des régulateurs SmtB/ArsR : un site nommé $\alpha 3N$ et un site nommé $\alpha 5$ (Busenlehner *et al.*, 2003; Pennella & Giedroc, 2005).

Le site $\alpha 3N$ implique des résidus cystéines situés dans le domaine N-terminal et dans le motif ELCVCD de l'hélice $\alpha 3$. La sphère de coordination de ce site comprend 3 à 4 résidus. Le site $\alpha 5$, quant à lui, est composé de résidus histidines et de carboxylates de l'hélice $\alpha 5$.

Il existe deux variantes de ces sites : ArsR présente un site $\alpha 3$ (aucun ligand issu du domaine Nter) et NmtR présente un site $\alpha 5C$ (certains ligands impliqués dans la coordination proviennent de l'extrémité C-ter).

Les sites $\alpha 5/\alpha 5C$ lient préférentiellement des ions métalliques divalents comme le Zn(II), le Ni(II) et le Co(II) alors que les sites $\alpha 3N/\alpha 3$ lient plutôt des métaux lourds de type Pb(II) ou encore Bi(II) (exception faite de celui de AztR qui lie aussi du Zn(II)).

Certains régulateurs n'ont qu'une classe de sites : soit $\alpha 3N/\alpha 3$ (AztR/ArsR), soit $\alpha 5/\alpha 5C$ (CzrA/NmtR), d'autres ont les deux sites $\alpha 3N/\alpha 5$ (SmtB / ZiaR / CadC de *S.aureus*) (Tableau I-6) mais n'en utilisent qu'un pour la régulation.

Les ligands présumés des sites métalliques de SmtB, CzrA et CadC sont connus. Ils ont été identifiés lors de la résolution des structures cristallographiques des régulateurs.

I.2.2.3. Caractéristiques structurales des membres de la famille SmtB/ArsR

Les structures de 3 membres de la famille SmtB/ArsR ont été résolues depuis 1998 : SmtB (Cook *et al.*, 1998; Eicken *et al.*, 2003), CzrA (Eicken *et al.*, 2003) et CadC (Ye *et al.*, 2005).

I.2.2.3.1. Les structures des protéines dites Apo

La résolution de la structure cristallographique de apo-SmtB de *Synechococcus PCC 7942* (Cook *et al.*, 1998; Eicken *et al.*, 2003) a montré qu'il s'agissait d'une protéine homodimérique avec un axe de symétrie. Chaque monomère de SmtB possède 5 hélices α et de 2 brins β avec un repliement de type $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3 \alpha 4$ (noté αR) $\beta 1 \beta 2 \alpha 5$ (Figure I.9A).

L'interface de dimérisation est constituée des hélices $\alpha 1$ N-terminale et $\alpha 5$ C-terminale de chaque sous unité.

Le domaine de liaison à l'ADN de type hélice coude hélice ailé est formé par $\alpha 3 \alpha 4 \beta 1 \beta 2$ où $\alpha 4$ servirait d'hélice de reconnaissance à l'ADN.

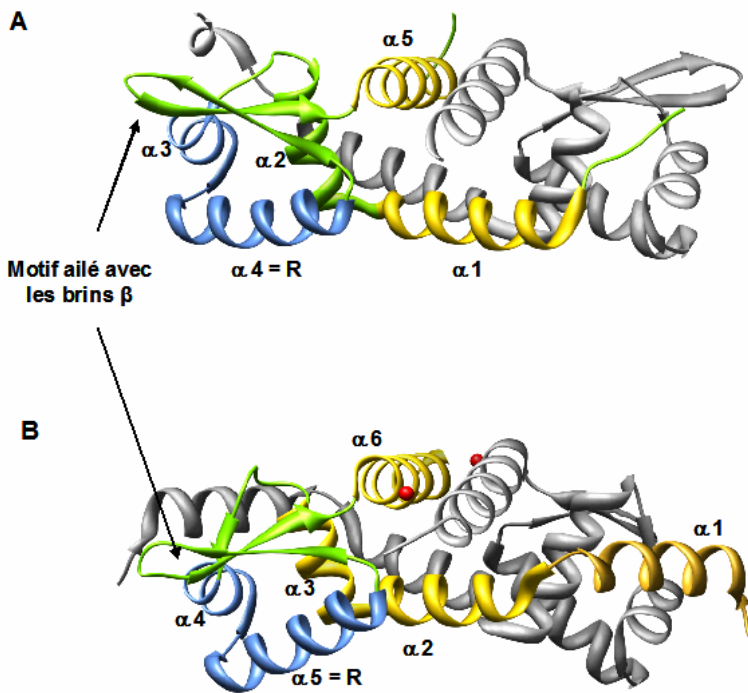


Figure I.9 Structures tridimensionnelles de (A) apo-SmtB de résolution 1.7 Å (Eicken *et al.*, 2003) et de (B) "apo" CadC de résolution 1.9 Å (Ye *et al.*, 2005). Domaine de liaison à l'ADN (Bleu) / Interface de dimérisation (Jaune) / Pour CadC : le zinc des sites $\alpha 5$ est en rouge.

En 2003, l'obtention par diffraction des rayons X de la structure de apo-CzrA de résolution 2.0 Å (Eicken *et al.*, 2003) a confirmé les données cristallographiques de SmtB et de RMN de apo-CzrA (Busenlehner *et al.*, 2003). Une différence est notable entre les deux structures apo de SmtB et de CzrA. Cette dernière est plus compacte.

En 2005, la structure cristallographique de « Apo » CadC de résolution 1.9 Å a été obtenue (Ye *et al.*, 2005). Bien que cette dernière soit qualifiée d'*apo*, elle possède du Zn(II) dans ses sites $\alpha 5$ qui ne sont pas les sites régulateurs. Des différences au niveau de la structure secondaire existent entre SmtB et CadC. Cette dernière a 6 hélices α et 3 brins β organisés avec un repliement de type $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3 \beta 1 \alpha 4 \alpha 5$ (noté αR) $\beta 2 \beta 3 \alpha 6$ (Figure L.9C)

L'interface de dimérisation est constituée des hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 6$ C-terminale de chaque sous unité. L'hélice $\alpha 1$ semble contribuer à la dimérisation en interagissant avec les hélices $\alpha 3'$ et $\alpha 4'$ du monomère adjacent favorisant la création d'un site $\alpha 3N$ inter sous-unités.

Le domaine de liaison à l'ADN de type hélice coude hélice ailé est formé par $\alpha 4$ $\alpha 5$ où $\alpha 5$ servirait d'hélice de reconnaissance à l'ADN.

I.2.2.3.2. Les structures des protéines métallées

Les structures des formes métallées de SmtB (dépourvue de son site $\alpha 3N$ (VanZile *et al.*, 2002b)) et de CzrA contenant 2 Zn(II) ont été résolues par cristallographie aux rayons X (Eicken *et al.*, 2003). La liaison des deux métaux induit des changements structuraux au niveau quaternaire. Ces changements sont particulièrement marqués pour SmtB métallée avec des mouvements de rotation/translation d'une sous unité par rapport à l'autre. Il a, par ailleurs, été montré pour SmtB, que suite à la métallation, un réseau de liaisons hydrogènes était mis en place. Ce réseau permet de mettre en relation des résidus coordonnant le métal du site $\alpha 5$ et de l'hélice de reconnaissance à l'ADN. Les changements imposés par ces liaisons tendent à changer la position relative des hélices de reconnaissance de l'ADN, ce qui pourrait expliquer la dissociation du complexe ADN/Protéine (Eicken *et al.*, 2003; Pennella & Giedroc, 2005).

I.2.2.4. Mécanisme d'action général

Les membres de la famille SmtB/ArsR régulent la transcription de gènes en liant un motif palindromique imparfait (motif 12-2-12 inversé) (Tableau I-7). Tous les membres possèdent un seul motif au niveau du promoteur régulé excepté SmtB qui en possède deux.

Régulateur	Opéron	Motif 12-2-12
SmtB	Smt A1 Smt A2	AACACATGAACA GT TATTCAGATATT CATACCTGAATC AA GATTCAGATGTT
ZiaR	Zia A	AATATCTGAGCA TA TCTTCAGGTGTT
CzrA	Czr AB	AATATATGAACA AA TATTCATATGAA
NmtR	Nmt A	AATAAATGAACA TA TGATCATATATT
AztR	Azt RA	TACAATTGAATA GT TGTTC AATTGTT
BxmR	Bxa 1 Bxm RA	ATAATATGAACA TC TATTCATACTAT AACATCTGAATA TA TGTTCAGATGTA
CadC	Cad CA	TACTACTCAAATA AA TATTTGAATGAA
ArsR	Ars RBCA	ATTAATCATATG CG CTTTTGGTTATG

Tableau I-7 Comparaison du motif palindromique imparfait (12-2-12 inversé) lié par les membres de la famille SmtB/ArsR (Busenlehner *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005)

Généralement ce motif (sauf pour SmtB) se situe en aval du motif -10 du promoteur régulé (Busenlehner *et al.*, 2003).

Aucune structure cristallographique d'un complexe ADN/Protéine n'a jusqu'à présent été résolue, le mode de fixation des régulateurs de la famille SmtB/ArsR à l'ADN n'est pas connu. Les études de liaison à l'ADN ont montré, que selon le régulateur impliqué, un à

quatre dimères peuvent se fixer sur l'ADN. Cette liaison est fonction de la longueur de la séquence et de la force ionique appliquée pendant les mesures.

Un mécanisme d'action des métallorégulateurs de la famille SmtB/ArsR peut être proposé (Figure I.10). En absence de métal, le régulateur est lié à l'ADN sur son palindrome imparfait (Tableau I-7). Le complexe de transcription (ARN polymérase et facteur sigma) ne peut pas initier la transcription des gènes.

La liaison du métal par le régulateur, dans ses deux sites, induit des changements conformationnels de ce dernier. Ces changements affecteraient la position relative des hélices de reconnaissance de l'ADN. Le régulateur métallé se dissocie de l'ADN, l'ARN polymérase peut se fixer correctement sur son promoteur et donc initier la transcription.

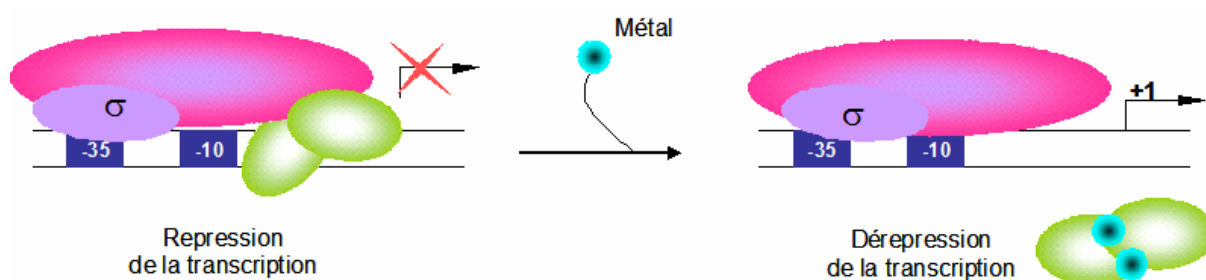


Figure I.10 Mécanisme d'action des métallorégulateurs de la famille SmtB/ArsR. En absence de métal, le métallorégulateur empêche la transcription des gènes. En présence de métal, la transcription est déreprimée en raison de la dissociation de complexe holo-protéine de l'ADN.

I.2.3. La famille des régulateurs DtxR

I.2.3.1. Généralités

Cette famille de régulateur qui doit son nom au premier membre identifié chez *Corynebacterium diphtheriae* DtxR (Diphtheria Toxin Regulator) est constituée de régulateurs transcriptionnels homodimériques qui répondent au stress métallique. Cette famille est largement présente chez des micro-organismes Gram + tels *Streptomyces*, *Corynebacterium*, et *Mycobacterium* ayant un pourcentage en guanine et cytosine élevé. Ces régulateurs, qualifiés de répresseurs, lient l'ADN en présence de leur cofacteur métallique. Cette liaison entraîne des changements conformationnels du régulateur qui activent l'homodimère et lui permettent de se lier à l'ADN sur une séquence palindromique. La transcription est de ce fait réprimée.

Quelques caractéristiques des membres de cette famille sont rapportées dans le [Tableau I-8](#).

Régulateur	Bactérie	Gènes régulés	Fonction contrôlée	Métal activateur in vivo	Références
DtxR	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Tox</i> , <i>irp1</i> à 5, <i>hmuO</i>	Synthèse de la toxine diphtérique, Importation du fer, Réponse au stress-oxydant	Fe ²⁺	(Pohl <i>et al.</i> , 1999a; Schmitt, 1997)
IdeR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>fbxA</i>	Importation du fer, Réponse au stress-oxydant, Synthèse d'enzyme impliquée dans le synthèse d'exochelin	Fe ²⁺	(Pohl <i>et al.</i> , 1999b; Schmitt <i>et al.</i> , 1995)
MntR	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>mntABCD</i> , <i>mntH</i>	Transport du Mn ²⁺ par un transporteur de type ABC et par un transporteur de la famille NRAMP	Mn ²⁺	(Que & Helmann, 2000; Schmitt, 2002)
TroR	<i>Treponema pallidum</i>	<i>troABCD</i>	Transport du Mn ²⁺ /Zn ²⁺ (?) par un transporteur de type ABC	Mn ²⁺ /Zn ²⁺	(Hazlett <i>et al.</i> , 2003; Posey <i>et al.</i> , 1999)

Tableau I-8 Caractéristiques de quelques membres de la famille DtxR

La famille DtxR peut être divisée en deux sous-familles, celle des IdeRs (Iron Dependent Regulator) à laquelle sont rattachées DtxR et IdeR et celle des MntRs (Manganese Transport Regulator) à laquelle est rattachée MntR. Elles ont deux sites métalliques par monomère. Ces sites sont soit indépendants (DtxR et IdeR (Pohl *et al.*, 1999a; Pohl *et al.*, 1999b)) soit de type binucléaire (MntR (Glasfeld *et al.*, 2003)). L'affinité de ces régulateurs (DtxR, MntR...) pour le métal varie de 10⁴ à 10⁷ M⁻¹ (D'Aquino *et al.*, 2005; Golynskiy *et al.*, 2006; Sen *et al.*, 2006) selon le site impliqué.

I.2.3.2. Caractéristiques structurales des membres de la famille DtxR

I.2.3.2.1. Aspect structural

Actuellement plus d'une trentaine de structures des membres de la famille DtxR (DtxR (Pohl *et al.*, 1998; Pohl *et al.*, 1999a; Schiering *et al.*, 1995)/IdeR (Pohl *et al.*, 1999b; Wisedchaisri *et al.*, 2004; Wisedchaisri *et al.*, 2007)/MntR (DeWitt *et al.*, 2007; Glasfeld *et al.*, 2003) associées) sont connues. Leurs résolutions ont permis de définir les fondements structuraux de cette famille, les sites métalliques et d'avancer des mécanismes d'activation pour la liaison à l'ADN de ces régulateurs.

Les membres de la sous-famille IdeRs présentent 3 domaines (Figure I.11A et B) :

- Un domaine de liaison à l'ADN avec un motif hélice-coude-hélice ailé qui implique les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ ainsi que les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ (motif ailé).
- Un domaine de dimérisation constitué de deux hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$. Ce domaine est lié au domaine de liaison à l'ADN par l'hélice $\alpha 4$.
- Un domaine de type SH3 avec un repliement particulier qui intervient dans la régulation de la dimérisation, la coordination du métal. Ce domaine peut également se lier à une région riche en proline (résidus 125-139) (Wang *et al.*, 1999; Wylie *et al.*, 2005).

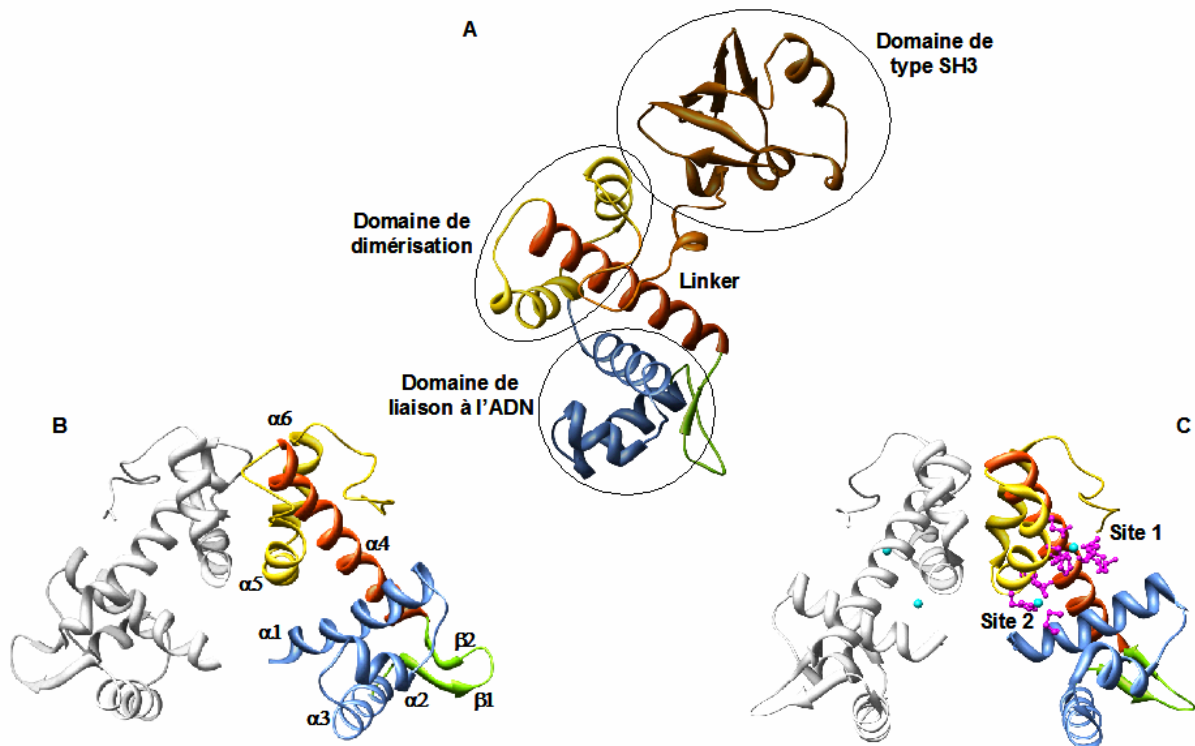


Figure I.11 Structures tridimensionnelles de Apo-DtxR de résolution 3.0 Å et de Co-DtxR de résolution 3.2 Å. (A) Visualisation de la structure d'une unité monomérique d'apo-DtxR dimérique (Pohl *et al.*, 1998), (B) apo-dtxR (Schiering *et al.*, 1995) et (C) Co-DtxR (Pohl *et al.*, 1999a). Domaine de liaison à l'ADN (Bleu) / Motif ailé (vert) / Linker (rouge) / Interface de dimérisation (Jaune) / Domaine de type SH3 (orange). Ce domaine n'est pas précisé en B et C pour la clarté de la figure.

Des domaines similaires ont été décrits pour MntR (Figure I.12) excepté le domaine de type SH3 (Glasfeld *et al.*, 2003). Le domaine de dimérisation de MntR implique une hélice α supplémentaire $\alpha 7$ qui tend à stabiliser l'état « dimérique » de apo-MntR en solution (Glasfeld *et al.*, 2003).

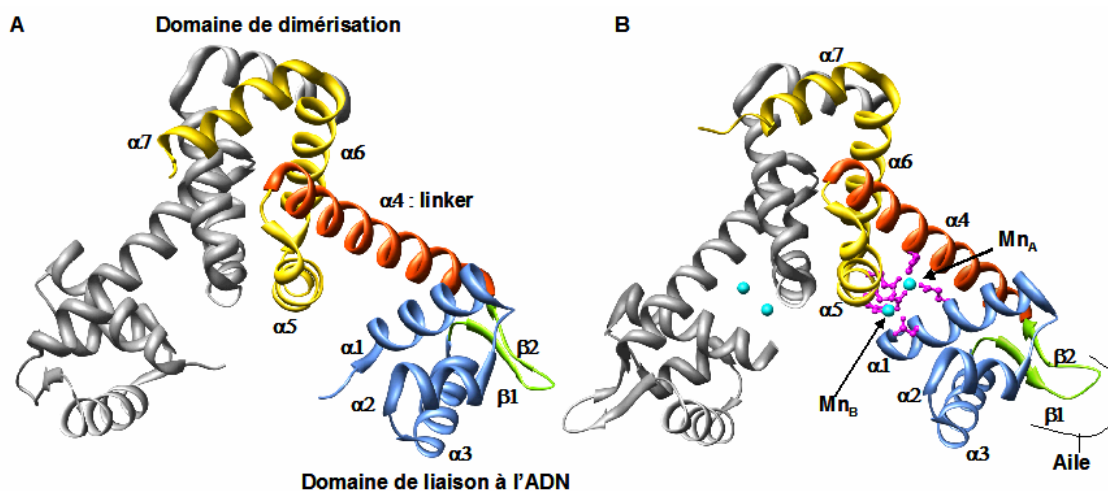


Figure I.12 Structures tridimensionnelles de (A) apo-MntR de résolution 2.8 Å (DeWitt *et al.*, 2007) et (B) Mn-MntR de résolution 2.4 Å (Kliegman *et al.*, 2006). Domaine de liaison à l'ADN (Bleu) / Motif ailé (vert) / Linker (rouge) / Interface de dimérisation (Jaune) / Manganèse (sphère cyan).

I.2.3.2.2. Site de métallation et structure

Les résolutions des structures par rayons X ainsi que les études par mutagenèse dirigée ont permis de caractériser les différents sites de métallation de ces métallo-régulateurs.

- Les sites dits « indépendants » (Figure I.11C) ont été caractérisés chez DtxR et chez IdeR (Pohl *et al.*, 1999a; Pohl *et al.*, 1999b). Ils sont qualifiés de site 1 ou auxiliaire et de site 2 ou primaire (D'Aquino *et al.*, 2005). Les constantes de dissociation de ces sites chez DtxR pour le Ni(II) sont de $2.10^{-7}M$ et $6.3.10^{-4}M$ respectivement. Elles ont été déterminées par des titrations calorimétriques (ITC). Ces valeurs fluctuent selon les auteurs et la technique utilisée mais restent toujours du même ordre de grandeur.

Le métal présent dans le site 1 de DtxR est coordonné par 5 ligands avec une géométrie de type « bipyramide trigonal ». Les résidus H79, E83 de l'hélice α_4 , H98 de l'hélice α_5 , E170 et Q173 du domaine de type SH3 sont impliqués dans la coordination du métal (Co^{2+}) (Pohl *et al.*, 1999a). Le métal présent dans le site 2 est coordonné par 5 ligands chez DtxR : les résidus C102 (*via* le soufre et le carbonyle), E105, H106 de l'hélice α_5 et M10 de l'hélice α_1 (Pohl *et al.*, 1999a).

Ces deux sites sont à une distance de 9 Å. Ils sont mis en connexion *via* une liaison impliquant H79 et E105 (Pohl *et al.*, 1999b).

Un troisième site a récemment été décrit chez IdeR, impliquant deux résidus histidines du domaine de type SH3 ainsi qu'une molécule de solvant (Wisedchaisri *et al.*, 2004). Son importance au niveau « biologique » n'est pas encore établie.

- Le site binucléaire à Mn(II) (Figure I.12B) a, quant à lui, été décrit chez MntR (Glasfeld *et al.*, 2003).

Les deux Mn(II) sont pontés par deux glutamates E102 et E11 et une molécule de solvant. Les autres ligands sont H77 (H79 chez DtxR) et E99 (C102 chez DtxR) et une molécule d'eau formant alors un octaèdre distordu pour le premier Mn(II)_A lié. Le second Mn(II)_B a également une géométrie octaédrique, il est coordiné par D8 (M10 chez DtxR), H103, deux molécules d'eau et les deux glutamates E102 et E11. Les deux Mn(II) sont séparés par 3.3 ou 4.4 Å (Glasfeld *et al.*, 2003; Kliegman *et al.*, 2006; Sen *et al.*, 2006) selon les études considérées.

I.2.3.2.3. Mécanisme d'activation des membres de cette famille

Le mécanisme d'activation des membres de cette famille (Figure I.13) ne peut être le même en raison de différences présentes tant au niveau structural, qu'au niveau des sites métalliques.

- Pour les IdeRs :

Apo-DtxR et apo-IdeR, en solution et à basse concentration, sont des monomères. Dans cet état, il a été montré que le domaine de type SH3 de DtxR se lie à une séquence d'acide-aminés de la région « 125-139 » qui assure la liaison entre les domaines N et C-ter (Wang *et al.*, 1999). Les protéines se trouvent sous deux formes à l'équilibre : une forme ouverte et une forme fermée. En présence de métal dans les sites métalliques de DtxR et de IdeR, l'équilibre monomère-dimère tend à être déplacé vers la formation de dimère ($K_d \sim \mu\text{M}$ à 33 nM (Spiering *et al.*, 2003)). La liaison du métal dans le site 1 tend à déplacer le domaine de type SH3 dont certains ligands sont impliqués dans la sphère de coordination.

L'utilisation de mutants DtxR soit du site 1, soit du site 2 a permis de mettre en évidence que le site 2 ou site primaire est essentiel pour l'activité de liaison à l'ADN du régulateur (Ding *et al.*, 1996; Spiering *et al.*, 2003). La métallation des sites 1 et 2 chez DtxR serait nécessaire à la dimérisation du régulateur (D'Aquino *et al.*, 2005) ce qui n'est pas le cas pour IdeR. L'utilisation de mutant du site 2 chez IdeR a permis d'établir que le site 1 est important pour la stabilisation et la dimérisation de ce régulateur et que le site 2 est impliqué dans la liaison à l'ADN (Chou *et al.*, 2004). Un processus où la métallation des régulateurs serait séquentielle doit avoir lieu pour en assurer l'activation. L'incorporation du métal dans le site 1 favorise la dimérisation (chez IdeR), ce changement permet alors la liaison du métal dans le second site. La liaison des cofacteurs est coopérative et dépendante de la dimérisation (Semavina *et al.*, 2006).

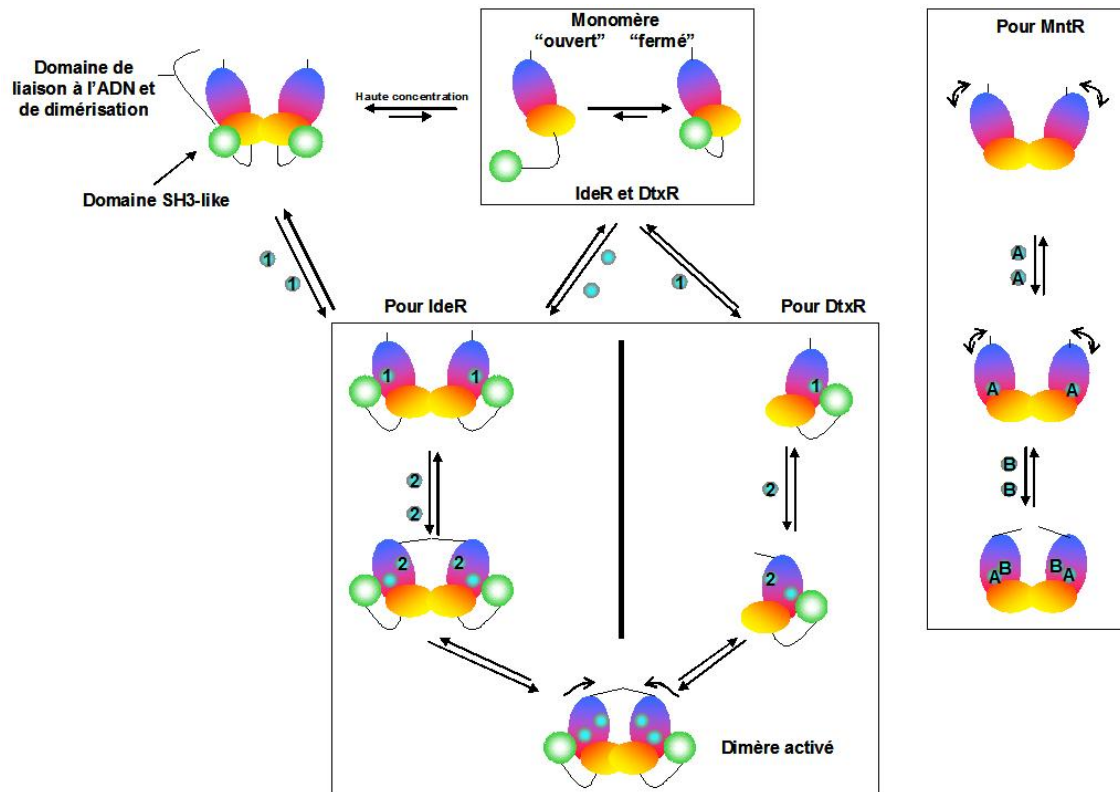


Figure I.13 Modèles d'activation pour IdeR (Chou *et al.*, 2004; Wisedchaisri *et al.*, 2004; Wisedchaisri *et al.*, 2007), DtxR (D'Aquino *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2004) et Mntr (DeWitt *et al.*, 2007) en plusieurs étapes. Ces mécanismes ont été proposés après recoupement de différentes données obtenues par cristallographie, mutagenèse dirigée, DLS, ultracentrifugation analytique, quench de fluorescence du tryptophane, ITC...

- Pour Mntr :

L'activation de Mntr ne peut pas suivre en totalité le processus des IdeRs. En effet, Apo-Mntr est un dimère stable en solution (Glasfeld *et al.*, 2003; Lieser *et al.*, 2003) qui ne présente pas de domaine de type SH3. En absence de métal, les deux domaines déjà structurés présentent une certaine flexibilité l'un par rapport à l'autre. La liaison du premier métal dans le site A tend à contraindre en partie le domaine de liaison à l'ADN ; ceci facilite la liaison du second métal. Le domaine de liaison est alors totalement contraint. Mntr est en mesure de se lier à l'ADN (DeWitt *et al.*, 2007; Golynskiy *et al.*, 2005; Lieser *et al.*, 2003).

I.2.3.3. Mécanisme d'action général

Les membres de la famille DtxR régulent la transcription de gènes en réponse à un métal soit le fer, soit le manganèse *in vivo*. Ces régulateurs se lient à un motif palindromique souvent imparfait (motif 9-1-9 inversé) (Guedon & Helmann, 2003; Lee & Holmes, 2000; Schmitt, 2002). Les motifs reconnus par les IdeRs présentent plus de similitudes entre eux que ceux reconnus par Mntr chez différents micro-organismes (Guedon & Helmann, 2003). Ce motif dans le cas de DtxR de *C. diphtheriae* peut être soit en aval du promoteur et chevaucher

partiellement la région -10 (cas du *ptox*), soit se situer entre les deux régions -10 et -35 du promoteur (cas du *phmuO*) soit chevaucher la région -35 du promoteur (cas de *IRP1*) (Lee & Holmes, 2000).

5'- TTAGGTTAG-C-CTAACCTAA -3'

Figure I.14 Séquence consensus reconnue par DtxR chez *Corynebacterium diphtheriae* (Lee & Holmes, 2000)

La résolution de structures par rayons X des complexes « Metal divalent-Protéine-ADN » (Figure I.15) a permis de proposer un mécanisme d'action des membres de cette famille (Figure I.16).

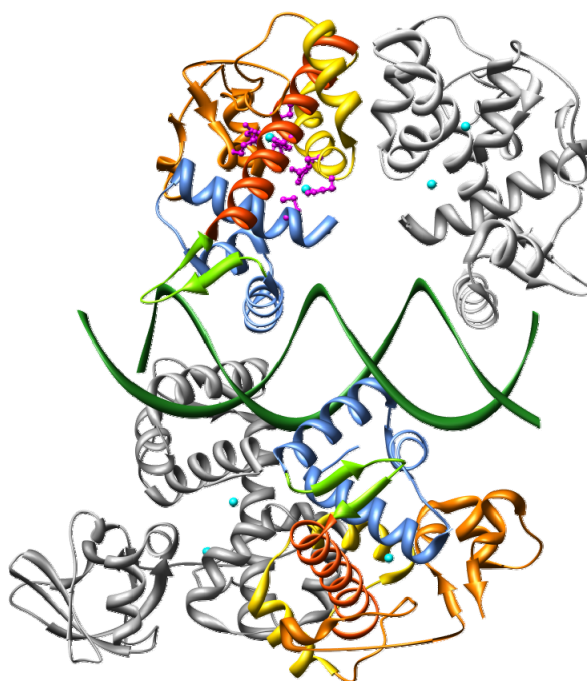


Figure I.15 Structure du complexe Co-DtxR-ADN (Pohl *et al.*, 1999a). Le complexe présente une stoechiométrie de 2 Homodimères:1 ADN. Domaine de liaison à l'ADN (Bleu) / Motif ailé (vert) / Linker (rouge) / Interface de dimérisation (Jaune) / Domaine de type SH3 (orange) / Co(II) (sphère cyan).

En absence de métal, les apo-protéines ne se lient pas à l'ADN. L'incorporation du métal dans les 2 sites de métallation entraîne un rapprochement des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 3'$ impliquées dans l'interaction avec l'ADN (déplacement du domaine N-ter par rapport au domaine de dimérisation). Présentant un meilleur alignement, elles peuvent alors interagir avec les grands sillons de l'ADN.

Deux homodimères (Pohl *et al.*, 1999a; Pohl *et al.*, 1999b; White *et al.*, 1998) se fixent sur la séquence palindromique sans présenter aucune interaction entre eux (Figure I.15 et Figure I.16).

Ce positionnement perturbe la liaison du complexe de transcription, cette dernière se voit réprimée.

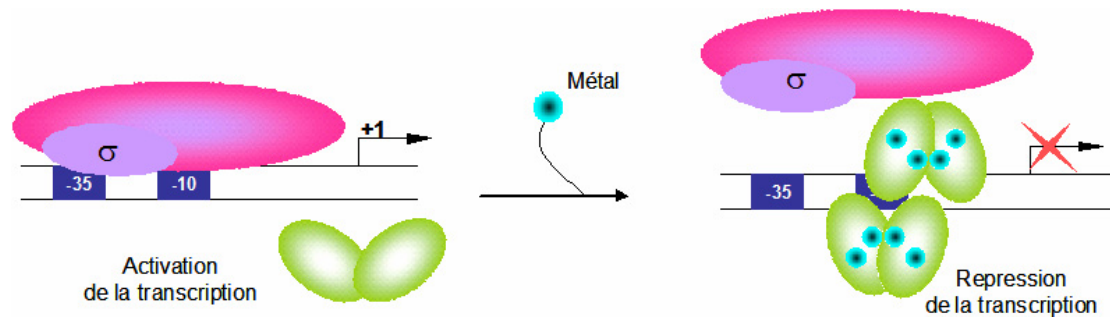


Figure I.16 Mécanisme d'action simplifié des métallorégulateurs de la famille DtxR. En absence de métal, la transcription des gènes a lieu. En présence de métal, la transcription est réprimée par un positionnement du métallorégulateur sur sa séquence opératrice.

Des études d'interactions IdeR/ADN suivies par anisotropie de fluorescence ont indiqué que la liaison à l'ADN est coopérative (Chou *et al.*, 2004). Le travail des auteurs ne permet pas de définir l'origine de la coopérativité. En effet, celle-ci peut provenir de la fixation d'un monomère sur l'ADN qui faciliterait la fixation d'un deuxième monomère par des interactions protéines/ADN et protéines/protéines. Une seconde hypothèse serait que la coopérativité observée provienne de la fixation d'un dimère sur l'ADN qui faciliterait la fixation d'un second dimère. En effet, bien qu'il n'existe pas de contact entre les dimères sur l'ADN, la structure de l'ADN est déformée par rapport à la structure canonique d'un ADN B (Pohl *et al.*, 1999a; Pohl *et al.*, 1999b; Wisedchaisri *et al.*, 2004). On peut donc supposer que la fixation d'un dimère entraîne une distorsion de l'ADN facilitant la fixation du deuxième dimère.

De nombreuses propriétés des membres de la famille de DtxR sont également des caractéristiques des membres de la famille de FUR.

I.2.4. La famille des régulateurs FUR

Les informations contenues dans cette partie ont été recueillies dans plusieurs revues (Lee & Helmann, 2007) et thèses (Pecqueur, 2005).

I.2.4.1. Généralités

Cette famille qui doit son nom au premier membre identifié chez *Escherichia coli* FUR (Ferric uptake regulator) (Bagg & Neilands, 1987; Hantke, 1981) est constituée de régulateurs homodimériques qui répondent à divers *stimuli* (métal, l'acidité, le stress oxydant). Les régulateurs de cette famille ont dans un premier temps été qualifiés de répresseur de la transcription qui après liaison de leur cofacteur métallique se lie sur une séquence opératrice (mode d'action principal : RDM pour Répression Directe par la protéine Métallée).

Cependant ce n'est pas l'unique mode d'action de ces régulateurs. Quatre autres modes, qui seront présentés par la suite (p- 62 -), ont été proposés selon le régulateur considéré et le micro-organisme dans lequel il intervient.

Quelques caractéristiques des membres de cette famille sont rapportées dans le Tableau I-9 :

Régulateur	Organisme	Métal structural /régulateur	Fonction(s)	Mode de régulation	Références
Fur	<i>E. coli</i>	Zn^{2+}/Fe^{2+}	Homéostasie du Fer (importation / utilisation / stockage)	RDM-AIM	(Ernst <i>et al.</i> , 2005a; Ernst <i>et al.</i> , 2005b; Lavrrar <i>et al.</i> , 2002; Masse & Gottesman, 2002; Masse & Arguin, 2005; Pohl <i>et al.</i> , 2003)
	<i>P. aeruginosa</i>	$Zn^{2+} (?)/Fe^{2+}$		RDM	
	<i>H. pylori</i>	$?/Fe^{2+}$		RDM-ADM-ADA-RDA	
Zur	<i>E. coli</i>	Zn^{2+}/Zn^{2+}	Importation du Zinc	RDM	(Outten <i>et al.</i> , 2001)
Mur	<i>R. leguminosarum</i>	$-/Mn^{2+} (Fe^{2+})$	Importation du Manganèse	RDM	(Diaz-Mireles <i>et al.</i> , 2004)
Nur	<i>S. coelicolor</i>	$?/Ni^{2+}$	Importation du Nickel	RDM	(Ahn <i>et al.</i> , 2006)
PerR	<i>B. subtilis</i>	$Zn^{2+}/Fe^{2+} (Mn^{2+})$	Stress oxydant	RDM-ADM	(Lee & Helmann, 2006a; Lee & Helmann, 2006b)
Irr	<i>B. japonicum</i>	$-/Fe\text{-Hème}$	Importation du Fer et le stress oxydant	ADA-RDA	(Hamza <i>et al.</i> , 1998; Rudolph <i>et al.</i> , 2006a; Rudolph <i>et al.</i> , 2006b; Yang <i>et al.</i> , 2006a; Yang <i>et al.</i> , 2006b)

Tableau I-9 Caractéristiques des certains membres de la famille FUR. Les modes de régulation sont définis par : 1^{ère} lettre R ou A pour Répression ou Activation _ 2nde lettre D ou I pour Direct ou Indirect _ 3^{ème} lettre M ou A pour présence du cofacteur métallique ou non.

Des sous-familles peuvent être proposées pour faciliter la description de cette famille. La première sous-famille concerne les FURs qui sont impliqués dans l'homéostasie du fer. La seconde sous-famille « FUR-like » comprend des régulateurs impliqués dans l'homéostasie de métaux autres que le fer (zinc, nickel, manganèse). La troisième sous-famille inclue PerR (senseur du stress oxydant) et Irr qui est un senseur de l'hème.

Les caractéristiques des membres de cette famille de métallorégulateurs vont être détaillées (structure / sites métalliques / mode d'action) avant de présenter quelques propriétés de FUR d'*Helicobacter pylori* dans le chapitre V. La caractérisation de cette protéine a été initiée au cours de mes travaux de thèse.

I.2.4.2. Caractéristiques structurales des membres de la famille FUR

Actuellement la structure « complète » d'un membre de chaque sous-famille a été résolue :

- FUR de *P. aeruginosa* de résolution 1.8 Å (Pohl *et al.*, 2003) notée PaFUR
- FurB renommée Zur de *M. tuberculosis* de résolution 2.7 Å (Lucarelli *et al.*, 2007; Maciag *et al.*, 2007) notée MtZur
- PerR de *B. subtilis* de résolution 1.75 Å (Traore *et al.*, 2006) notée BsPerR

La structure cristallographique du domaine N-ter de FUR d'*E.coli* de résolution 1.8 Å (Pecqueur *et al.*, 2006) notée EcFUR₁₋₈₂ a également été résolue.

La résolution de la structure de PaFUR métallée a permis de confirmer les fondements structuraux de la famille FUR. Ces régulateurs sont des homodimères qui comprennent deux domaines (Figure I.17):

- Un domaine de liaison à l'ADN du côté N-terminal
- Un domaine de dimérisation du côté C-terminal

Chez PaFUR (Figure I.17A), le domaine de liaison à l'ADN comprend quatre hélices α et deux brins β formant un feuillet β antiparallèle. Le motif de ce domaine permettant la liaison à l'ADN est, comme pour DtxR, un motif hélice coude hélice ailé. L'hélice α_4 sert d'hélice de reconnaissance. Le domaine de liaison à l'ADN de PaFUR est similaire à celui de DtxR, cependant il comprend une hélice α supplémentaire en N-ter « α_1 ». Cette hélice, présente également chez BsPerR, est à l'inverse absente du domaine de liaison à l'ADN de MtZur. Cette dernière possède toutefois une première hélice très longue. L'hélice de reconnaissance de l'ADN de MtZur est α_3 .

Le domaine de dimérisation de PaFUR est constitué de trois brins β dont β_5 et d'une longue hélice α (α_5) issus de chaque sous-unité monomérique. Une hélice α supplémentaire est présente chez BsPerR à l'extrémité C-ter « α_6 ».

Même si les repliements de MtZur et de BsPerR sont fortement similaires à celui de PaFUR, les réarrangements spatiaux des deux domaines diffèrent nettement (Figure I.17B et C) ce qui suggère que le mécanisme d'activation de ces régulateurs doit différer (mouvements différents des domaines de liaison à l'ADN par rapport au domaine de dimérisation au niveau de la région charnière).

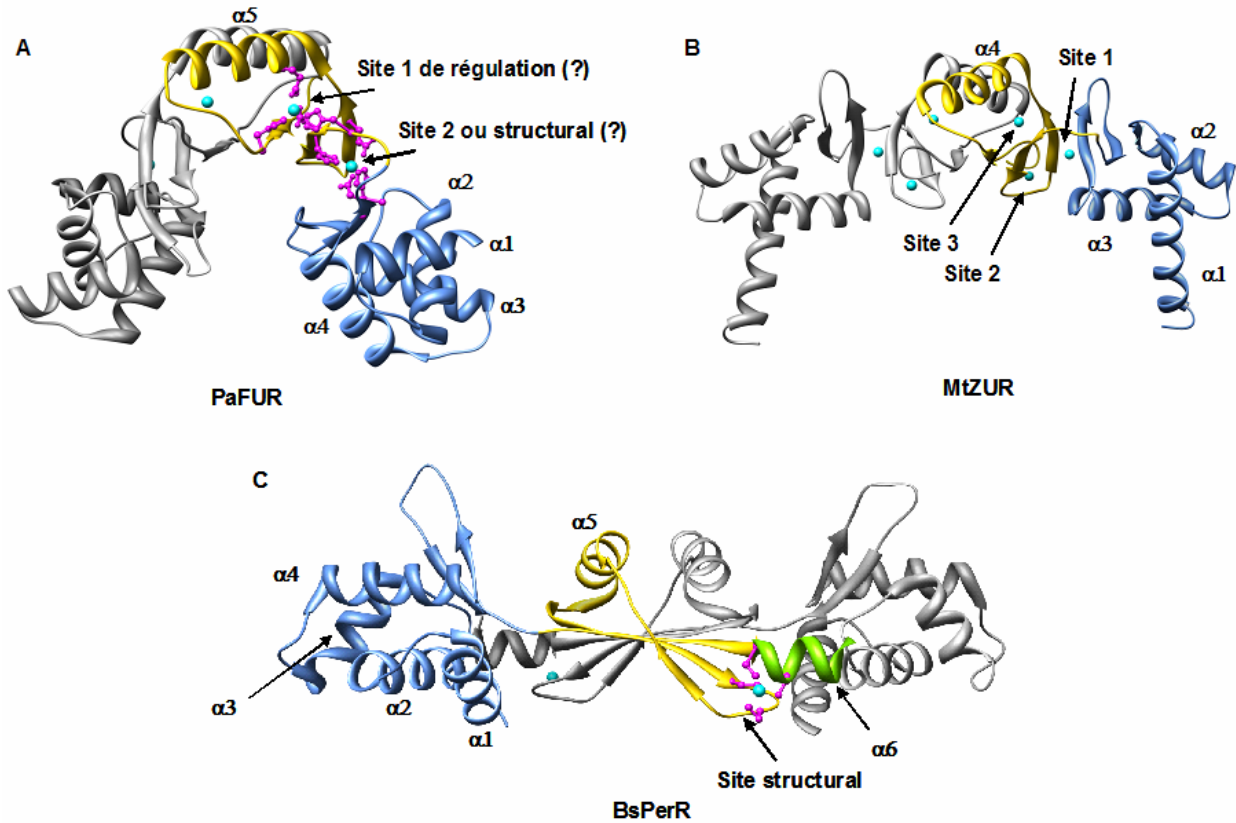


Figure I.17 Structures tridimensionnelles de (A) Zn₁Zn₂PaFUR de résolution 1.8 Å (Pohl *et al.*, 2003), (B) Zn₁Zn₂Zn₃MtZur de résolution 2.7 Å (Lucarelli *et al.*, 2007) et (C) Zn₁BsPerR de résolution 1.75 Å (Traore *et al.*, 2006). Domaine de liaison à l'ADN (Bleu) / Domaine de dimérisation (Jaune) / Zinc (sphère cyan).

Une étude portant sur la caractérisation structurale de FUR d'*E.coli* par RMN et par diffraction des rayons X a également été réalisée (Pecqueur *et al.*, 2006). Cette dernière étude a montré que les structures secondaires de Zn₁Zn₂PaFUR (forme activée) et de Zn₁EcFUR (« Apo » EcFUR) sont identiques mis à part pour l'hélice α1. En effet, cette dernière n'est pas structurée chez Zn₁EcFUR bien qu'elle soit prédite au regard de la séquence chez *E.coli* et observée sur le monomère oxydé de EcFUR. La résolution à 1.8 Å de la structure du domaine N-ter de EcFUR, a permis d'observer cette hélice et de constater que les domaines de liaison à l'ADN de PaFUR et EcFUR étaient superposables. Il a été proposé que la structuration de cette hélice dans le domaine N-ter soit provoquée par la liaison du métal.

I.2.4.3. Les sites métalliques

Les différents ligands des sites métalliques de EcFUR, PaFUR, MtZUR et de BsPerR sont précisés sur un alignement de séquence (Figure I.18).

```

EcFUR  -----MTDNN TALKKAGLVTLPR LKILEVLQEPDNH HVS AEDLYKRLIDMGEEIGLATV  55
PaFUR  -----MVEN-SEL RKAGLVTLPRVKILQMLDSAEQRMS AEDVYKALMEAGEDVGLATV  54
MtZUR  -----MSAAGVRSTRQRAAISTLLET LDD-FRSAQELHDELRRRGENIGLTTV  47
BsPerR MAAHELKEALET LKETGVRITPQRHAILEYLVNSMA-HPTADDIYKALEGKFPNMSVATV  59

EcFUR  YRVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHDHLICLDCGKVIEFSDDSI EARQREIA  115
PaFUR  YRVLTQFEAAGLVVRHNFDDGGHAFFELADSGHHDHMVCVDTGEVIEFMDAEIKRQKEIV  114
MtZUR  YRTLQSMASGLVDTLHTDTGESVYRRCSEHHHHLVCRSCGSTIEVGDHEVAWAAEVA  107
BsPerR YNNRVVFRESGLVKELTYGDASSRFDFVTS-DHYHAICENCGKIVDFHYPLGLDEVEQLAA  118

EcFUR  AKHGIRLTNHS LYL YGHCAEGDCREDEHAHEGK  148
PaFUR  RERGFELVDNLVLY-----VRKKK-----  134
MtZUR  TKHGFSDVSGTIEIFG-----TCSDRS-----  130
BsPerR HVTGFKVSHHRLEIYG-----VCQECSKKENH-  145

```

Figure I.18 Les différents ligands des sites métalliques de plusieurs membres de la famille FUR. En rouge : ligand du site structural ; en bleu : ligand du site de régulation ; en noir souligné : ligand potentiel mais non observé du site de régulation ; en vert : ligand du site 3 de MtZUR.

I.2.4.3.1. Les sites de FUR d'*Escherichia coli*

Lors de la caractérisation de FUR d'*Escherichia coli*, il a été montré que cette dernière avait 2 sites métalliques par monomère et que ces sites n'avaient pas la même affinité pour le métal.

Ces sites métalliques ont été caractérisés au travers d'études spectroscopiques (XAS, UV-Vis) (Adrait *et al.*, 1999; Gonzalez de Peredo *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998).

Le métal du site de régulation chez EcFUR est coordonné par 6 ligands dont au moins 3 azotes provenant de résidu histidine, 1 oxygène provenant soit d'un résidu aspartate soit d'un résidu glutamate et 2 autres atomes (N/O). Il présente une géométrie octaédrique. Parmi les douze histidines de EcFUR, les histidines 32, 86, 87, 89 et 124 sont très conservées ; mais seules les histidines 32 et 89 sont indispensables à l'activité de EcFUR (Braun *et al.*, 1990; Coy *et al.*, 1994). Ces deux histidines ont donc été proposées comme ligands.

Le zinc du site structural est coordonné par 2 soufres provenant des résidus cystéine 92 et cystéine 95 (motif CX₂C) et par 2 autres atomes pouvant être soit 1 azote et 1 oxygène soit 2 azotes (Gonzalez de Peredo *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998). Ce site présente une géométrie tétraédrique qui tend à être distordue lorsque le site de régulation est métallé. Ce site structural est important pour la stabilisation du dimère (Pecqueur *et al.*, 2006). Il a par ailleurs été montré que les cystéines 92 et 95 étaient indispensables pour l'activité de EcFUR (Coy *et al.*, 1994) contrairement aux cystéines 132 et 137 (motif CX₄C). Les cystéines du motif CX₂C semblent importantes pour la structure des protéines FURs (Lee & Helmann, 2007). Toutefois toutes les protéines FUR ne présentent pas ce genre de motif, c'est le cas de FUR de *P. aeruginosa*.

I.2.4.3.2. Les sites de FUR de *Pseudomonas aeruginosa*

Pour FUR de *P. aeruginosa*, deux sites ont été identifiés lors de la résolution de la structure (Pohl *et al.*, 2003).

Le site 1 est situé dans le domaine de dimérisation, le zinc est coordonné par 6 ligands (H86, D88 bidentate, E107, H124 et une molécule d'eau) (Figure I.17A). Il présente une géométrie octaédrique distordue.

Le site 2 implique des ligands du domaine de dimérisation et du domaine de liaison à l'ADN (H32, E80, H89 et E100). Il présente une géométrie tétraédrique.

Il a été proposé par Polh *et al.* suite à des expériences d'EXAFS faites au seuil du fer que les sites 1 et 2 soient les sites de régulation et structural respectivement.

Cependant il a été montré par mutagenèse dirigée que des substitutions de résidus amino-acides du site 1 ne perturbaient pas les fonctions de PaFUR, contrairement à celles faites dans le site 2 (Lewin *et al.*, 2002). Le site 1 ne peut être le site de régulation. Le site 2 pourrait correspondre au site de régulation (Lewin *et al.*, 2002). D'autres données portant sur la caractérisation des sites des protéines FUR et FUR-like tendent à renforcer cette proposition.

I.2.4.3.3. Les sites de ZUR de *Mycobacterium tuberculosis*

Pour Zur de *Mycobacterium tuberculosis*, la résolution de la structure a permis de décrire 3 sites métalliques capables de lier du zinc (Lucarelli *et al.*, 2007).

Le site 1 se situe dans la région charnière entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de dimérisation (Figure I.17B). Ce site présente une géométrie tétraédrique, les ligands de la sphère de coordination sont les résidus Asp 62, Cys 76, His 81 et His 83. Le métal présent dans ce site est échangeable avec du cobalt. Ce site est proposé comme site de régulation.

Le site 2 se situe dans le domaine de dimérisation. Ce site présente également une géométrie tétraédrique, les ligands du zinc sont les 4 soufres des cystéines 86-89 et 126-129. Ces cystéines présentent un motif particulier : CX₂C-n-CX₂C. Ce site est proposé comme site structural.

Le troisième site est également présent dans le domaine de dimérisation. Il implique de nouveau 4 ligands pour coordonner le zinc (3 histidines 80-82-118 et 1 glutamate 101). Curieusement, les ligands de ce site appartiennent au site 1 de PaFUR (initialement proposé comme site de régulation).

Jusqu'à présent aucune fonction n'a été attribuée à ce site, il pourrait s'agir d'un second site structural, d'un second site de régulation ou alors d'un artefact expérimental. Cependant, si l'on considère son homologue chez *E.coli*, deux sites métalliques ont seulement été identifiés

par des mesures spectroscopiques (Outten *et al.*, 2001). Leurs caractéristiques sont proches de celles des sites 1 et 2 retrouvés chez MtZUR. Le site 3, de ce fait, ne semble pas indispensable.

I.2.4.3.4. Les sites de PerR de *Bacillus subtilis*

Pour PerR de *Bacillus subtilis*, 2 sites métalliques ont été proposés (Lee & Helmann, 2006a; Lee & Helmann, 2006b; Traore *et al.*, 2006).

Le site structural à zinc comprend les 4 cystéines des 2 motifs CX₂C (C96, C99, C136 et C139). Il se situe dans le domaine de dimérisation (Figure I.17C).

D'après un modèle appliqué à la structure de BsPerR apo (rotation de 160° du domaine C-ter par rapport au domaine N-ter), il semblerait qu'il puisse exister, moyennant cette rotation, un site de régulation potentiel à fer ou à manganèse qui soit pentacoordonné. Il se situerait dans la région charnière entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de dimérisation. Le métal pourrait être coordonné par les résidus His 37, Asp 85, His 91, His 93 et Asp 104. Ces ligands correspondraient aux ligands du site 2 de PaFUR. *In vivo*, ces résidus semblent essentiels pour la fonction de répresseur de BsPerR ; il reste à démontrer que ces résidus sont les ligands du fer *in vitro*.

I.2.4.4. Mécanismes d'activation des régulateurs

La simple comparaison des structures tridimensionnelles des régulateurs suggère que ces différents membres doivent présenter des mécanismes d'activation propres afin d'assurer leur fonction. Deux mécanismes d'activation ont été proposés d'une part pour PerR de *B. subtilis* et d'autre part pour FUR d'*E.coli* (recoupement de données biochimiques et structurales entre EcFUR et PaFUR) (Figure I.19).

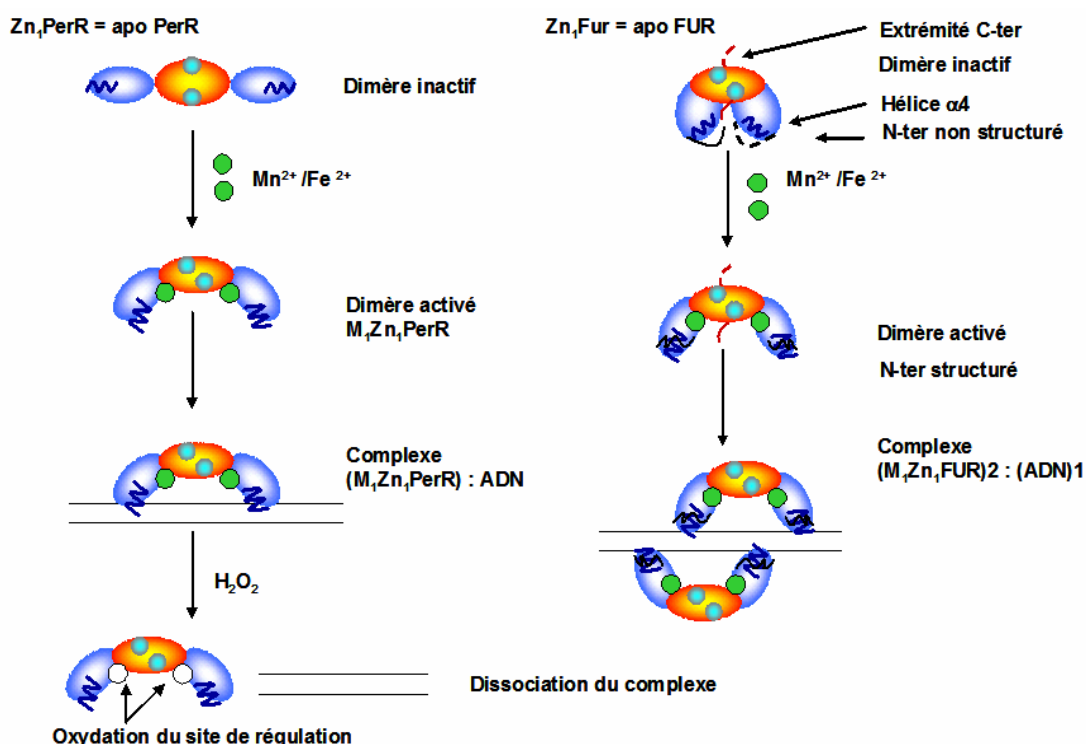


Figure I.19 Schéma des mécanismes d'activation hypothétiques de BsPerR et de EcFUR

I.2.4.4.1. Mécanisme d'activation de BsPerR

PerR, qui « détecte » le peroxyde d'hydrogène, présente deux niveaux d'activation (Lee & Helmann, 2006a; Lee & Helmann, 2006b; Lee & Helmann, 2007; Traore *et al.*, 2006). Le premier niveau d'activation doit lui permettre d'assurer sa fonction de répresseur de la transcription de gènes. Il consiste en la métallation du site de régulation à fer ou à manganèse. En considérant la structure RX allongée de apo-PerR, cette dernière ne peut lier le métal dans son site de régulation simplement. Cette incorporation semble nécessiter une rotation de 160° du domaine de dimérisation par rapport au domaine de liaison à l'ADN. Cette rotation permettrait alors le repositionnement des ligands de la sphère de coordination du site de régulation (Traore *et al.*, 2006). Le dimère de PerR activé serait capable de lier l'ADN (Figure I.19).

Le second niveau d'activation doit permettre à PerR d'assurer sa fonction de « détecteur » du peroxyde d'hydrogène. En présence d'H₂O₂, PerR subirait une oxydation des histidines 37 et/ou 91 du site de régulation *via* un mécanisme d'oxydation catalysé par le métal (Lee & Helmann, 2006a). Cette oxydation entraînerait la formation de 2-oxo-histidine et induirait une diminution de l'affinité de la protéine pour son métal de régulation. Cette oxydation lèverait la répression de PerR par dissociation du complexe Protéine/ADN (Figure I.19).

I.2.4.4.2. Mécanisme d'activation de EcFUR

EcFur contrairement à PerR ne présenterait qu'un niveau intégré d'activation lui permettant d'assurer sa fonction de régulateur de la transcription (Figure I.19). Le métal présent dans son site structural, permet de stabiliser sa structure quaternaire à l'état de dimère (Pecqueur *et al.*, 2006) et non pas de l'activer. L'activation est permise par la liaison du métal (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} ...) dans le site de régulation. Cette incorporation entraîne des changements de la conformation de la protéine avec une exposition plus importante de l'hélice $\alpha 4$ au solvant.

Une meilleure exposition des domaines de liaison à l'ADN aurait lieu (Coy & Neilands, 1991; Gonzalez de Peredo *et al.*, 2001). Cet aspect a été confirmé par des études de cross-link à l'EDC et au DMA (D'Autreaux *et al.*, 2007). Le groupement $-NH_2$ de l'extrémité N-terminale interagit *via* des interactions ioniques avec un ou plusieurs résidus acides du domaine C-terminal et est aussi à proximité des lysines 76 et 97 de la région centrale chez Zn_1EcFUR (dimère inactif). Ces interactions impliquent une proximité spatiale. Ces dernières n'ont plus lieu lors de la métallation du site de régulation (M_1Zn_1EcFUR = dimère activé), preuve d'un éloignement de l'extrémité N-ter et du domaine C-ter. Par ailleurs il a été montré au laboratoire lors d'études structurales que l'extrémité N-terminale était plus ou moins structurée en fonction de l'état d'activation de la protéine (Pecqueur *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2003). Zn_1Zn_2PaFUR qui correspond à la forme active de FUR présente une hélice $\alpha 1$ à l'extrémité N-terminale, contrairement à Zn_1EcFUR , forme inactive de la protéine, qui ne présente pas cette hélice. Il a donc été proposé que la métallation du site de régulation entraînerait des changements conformationnels locaux avec entre autre une structuration de l'hélice $\alpha 1$ et un repositionnement de l'hélice $\alpha 4$ pour permettre la liaison à l'ADN.

I.2.4.5. Modes de régulation

I.2.4.5.1. Généralités

Initialement les membres de cette famille de métallorégulateurs étaient qualifiés de répresseurs de la transcription par liaison d'une séquence opératrice de 19 pb. Cependant, il a été montré que ces régulateurs contrôlaient l'expression des gènes par quatre autres mécanismes de répression ou d'activation, directs ou indirects dépendants ou non d'une métallation de FUR (Figure I.20).

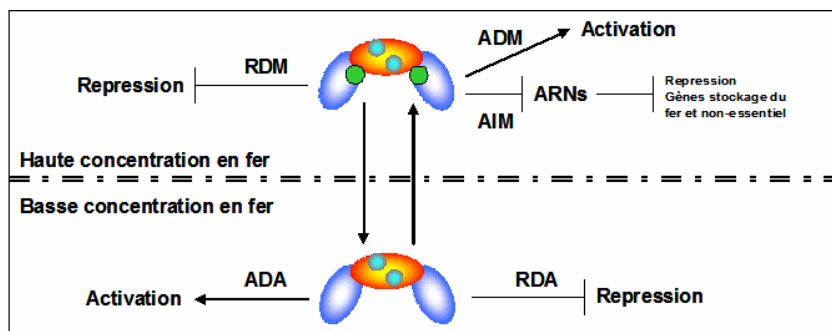


Figure I.20 Les différents modes de régulations des protéines FUR (Lee & Helmann, 2007)

- Répression Directe de la transcription en présence du cofacteur Métallique (RDM)
- Activation Directe de la transcription en présence du cofacteur Métallique (ADM) (Alamuri *et al.*, 2006)
- Activation Indirecte de la transcription en présence du cofacteur Métallique (AIM) (via l'inhibition d'un partenaire intermédiaire) (Masse & Gottesman, 2002)
- Activation Directe de la transcription par la protéine Apo (ADA) (Delany *et al.*, 2003)
- Répression Directe de la transcription par la protéine Apo (RDA) (Ernst *et al.*, 2005b)

Seules les régulations réalisées par quelques membres de la sous-famille FURs seront présentées.

I.2.4.5.2. La régulation par FUR d'*E.coli*

FUR d'*E. coli* qui est le premier représentant de cette famille de protéine métallorégulatrice à avoir été étudié, contrôle l'expression de plus de 100 gènes (Hantke, 2001). Soixante de ces gènes codent pour des protéines permettant l'acquisition du fer (la machinerie de synthèse et de transport des sidérophores ...). D'autres gènes codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme (aconitase A) ou encore dans la réponse au stress-oxydant (SodB). EcFUR, qui est assimilable à un facteur de virulence, est un régulateur global. Elle contrôle l'expression de ces gènes soit par répression ([Figure I.20A](#)) soit par activation ([Figure I.20C](#)) en liant une séquence palindromique imparfaite ([Figure I.21A](#)).

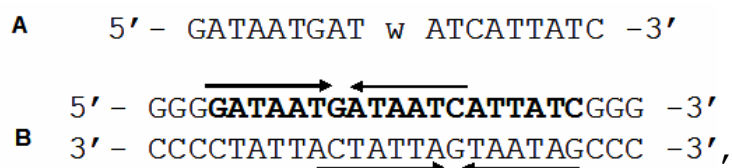


Figure I.21 A) Séquence consensus de la FUR box où w correspond à A/T (Escolar *et al.*, 1998). B) Mode de liaison de FUR à l'ADN, reconnaissance d'un motif 6-1-6 (Lavrrar & McIntosh, 2003)

Plusieurs modèles ont été proposés pour la liaison de FUR à l'ADN (Baichoo & Helmann, 2002; Baichoo *et al.*, 2002; Escolar *et al.*, 1999; Lavrrar & McIntosh, 2003; Lee & Helmann, 2007). L'un d'eux, présenté par Baichoo *et al.*, proposait que FUR reconnaisse 15 pb organisées en un motif 7-1-7 chez *B. subtilis*. Dans ce modèle, deux dimères de FUR peuvent se lier sur chaque FUR box et ce sur des faces opposées de la double hélice d'ADN (Baichoo & Helmann, 2002). Ce modèle expliquerait l'enroulement de FUR sur l'ADN observé par De Lorenzo *et al.* en 1988 (de Lorenzo *et al.*, 1988). Un modèle similaire a été proposé chez *E.coli* par Lavrrar *et al.* Toutefois le motif reconnu serait de type 6-1-6 (soit 13pb) répété deux fois de façon inversée et constituant le motif de 19pb lié par EcFUR (Figure I.21B) (Lavrrar *et al.*, 2002; Lavrrar & McIntosh, 2003).

Ce modèle est compatible avec les données de positionnement de FUR sur l'ADN obtenues suite à une étude des pontages covalents du complexe EcFUR-ADN analysés par spectrométrie de masse (Tiss *et al.*, 2005). La proximité de la tyrosine 55 se trouvant dans l'hélice de reconnaissance avec le doublet de thymine de la boîte FUR contenue dans les promoteurs régulés par FUR a été démontrée. Cette proximité doit être importante pour la liaison ADN/protéine de toutes les Fur-like dont Zur et PerR de *Bacillus subtilis* puisque que la tyrosine et le doublet de thymine sont conservés.

Les régulations par EcFUR dépendent essentiellement de la concentration en fer dans la bactérie. Lorsque ce dernier est limitant pour sa survie, elle va produire et libérer des molécules très affines pour le chélater, les sidérophores (entérobactine..). Ces molécules sont capables de solubiliser le fer à partir de complexes insolubles (hydroxyde ferrique) et d'entrer en compétition avec des protéines de transport du fer chez l'hôte comme la transferrine. En parallèle, *E.coli* exprime à sa membrane des récepteurs (FepA...) de sidérophores pour récupérer le complexe métallé ainsi que des systèmes de transport (FepB/FepDGC) pour transférer le complexe dans le cytoplasme. Ces transporteurs sont couplés à une machinerie énergétique ExbB/ExbD/TonB. En présence de fer, EcFUR est activée pour former Fe-EcFUR et peut alors réprimer la transcription des gènes impliqués entre autre dans cette machinerie d'acquisition du fer (Figure I.22).

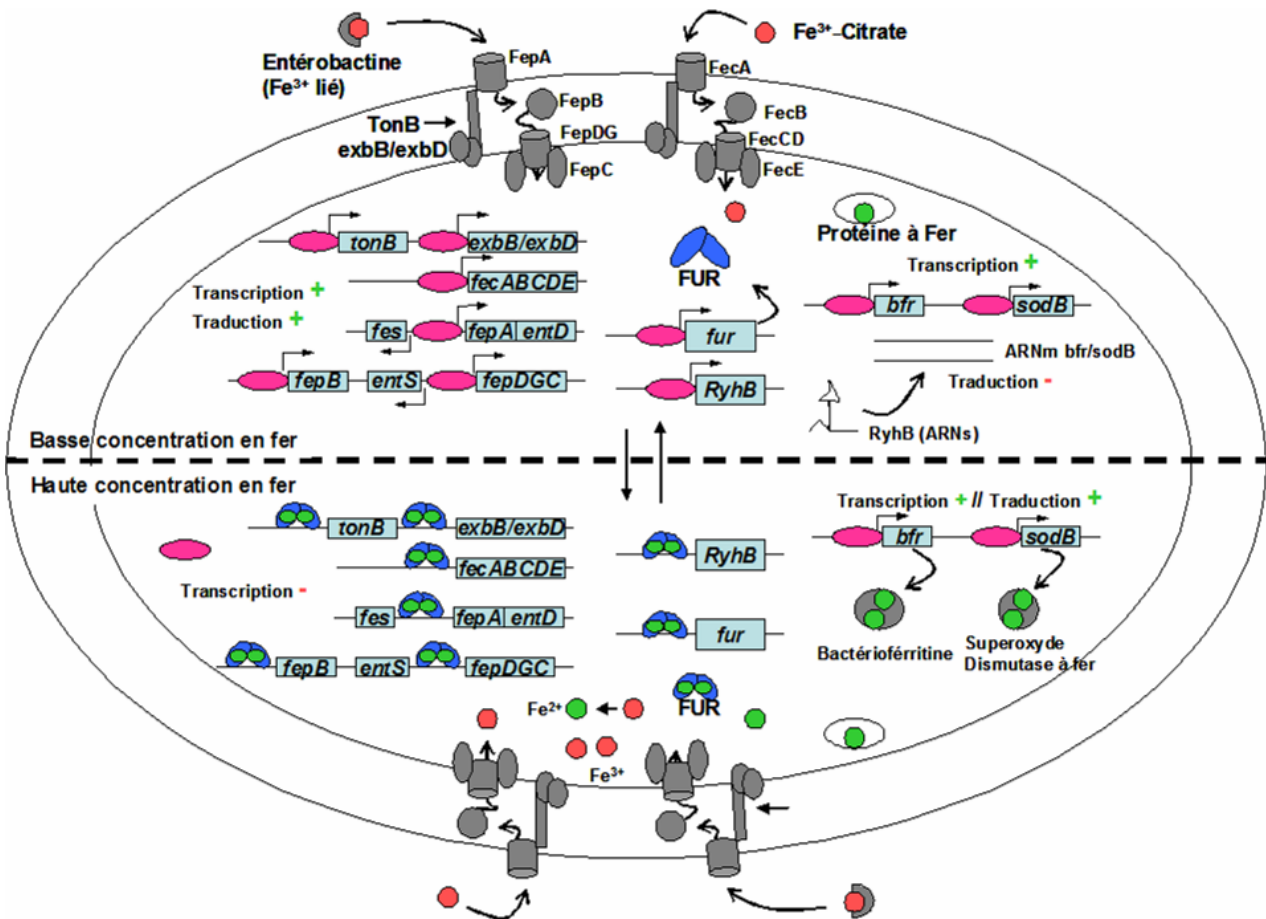


Figure I.22 Mécanisme d'action de FUR d'*E. coli* dans des conditions de carence en fer (partie supérieure du schéma) ou de forte concentration en fer (partie inférieure du schéma) : Contrôle de l'homéostasie du fer par des régulations négatives et positives. ● : ARN polymérase

Autant le mode de régulation de EcFUR par répression directe en présence de métal semble évident, autant le mode de régulation par activation en présence de métal suscite encore de nombreuses interrogations. EcFUR active-t-elle directement ou indirectement ces gènes comme celui de la superoxyde dismutase à fer SodB et de la bactéroferritine ? En 2002, il a été montré que cette régulation positive par EcFUR était indirecte. Cette régulation dépendante de FUR est assurée *via* la répression de petits ARN régulateurs anti-sens (notés ARNs) (Masse & Gottesman, 2002). Ces ARNs agissent au niveau post-transcriptionnel en réprimant la traduction des gènes cibles. Globalement, la répression par EcFUR de ces ARNs « répresseurs » conduit à un phénotype d'activation. Chez *E. coli*, RyhB, un ARNs de 90 nucléotides, est réprimé par EcFUR en présence de fer (Masse & Arguin, 2005). Des motifs FUR box chevauchant le promoteur de *ryhB* ont été décrits (Vassinova & Kozyrev, 2000). Les expressions de la superoxyde dismutase à fer SodB et de la bactéroferritine sont dépendantes de ce mécanisme de régulation (Figure I.22). RyhB contrôle au minimum l'expression de 18 opérons soit environ 56 gènes. Un contrôle fin du métabolisme du fer est fait chez *E. coli*

grâce à EcFUR ainsi que RyhB (Masse & Arguin, 2005; Masse *et al.*, 2007). Les modes de régulation « RDM » et « AIM » sont donc utilisés par EcFUR.

I.2.4.5.3. Les autres modes de régulation

Les protéines FUR autres que EcFUR peuvent activer la transcription de gènes *via* un mécanisme direct (Figure I.20B). FUR de *Neisseria meningitidis*, en plus de réprimer l'expression de gènes comme *tbp2*, peut activer l'expression de certains gènes comme *norB*, *panI* (Delany *et al.*, 2004). FUR métallée se lie en amont des promoteurs de ces gènes et peut, au moins pour *norB*, activer la transcription. Une activation directe de l'expression du gène *nifS*, *via* la liaison de FUR métallée d'*Helicobacter pylori*, a également été proposée (Alamuri *et al.*, 2006). FUR métallée se lie à deux régions en amont du promoteur de *nifS* (-155_-190 et -210_-240).

Ce mode de régulation n'est pas unique pour FUR d'*Helicobacter pylori* (HpFUR). En effet cette dernière peut également réprimer la transcription des gènes en présence de métal, ainsi qu'activer et réprimer la transcription d'autres gènes en absence de métal (Delany *et al.*, 2001; Delany *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2005a; Ernst *et al.*, 2005b; Lee *et al.*, 2004). Les caractéristiques structurales qui différencient les sites liés par HpFUR en absence ou en présence de métal n'ont pas été élucidées. Toutefois cette capacité que présente HpFUR, à lier des sites distincts en présence ou en absence de métal, semble influencer sa fonction de protéine autorégulatrice (Delany *et al.*, 2002; Delany *et al.*, 2003). Les modes de régulation d'HpFUR seront présentés plus en détail ultérieurement dans le chapitre V qui lui est consacré.

I.2.5. La famille des régulateurs NikR

Cette famille qui doit son nom au premier membre identifié chez *Escherichia coli* NikR (De Pina *et al.*, 1999) est constituée de régulateurs tétramériques qui répondent à la concentration intracellulaire en nickel. Actuellement seuls trois membres de cette famille ont été étudiés au niveau biochimique et/ou au niveau structural et au niveau « mécanistique » : NikR d'*Escherichia coli* (bactérie du tractus digestif généralement commensale) et NikR d'*Helicobacter pylori* (bactérie pathogène pour l'Homme) (Dosanjh & Michel, 2006) et NikR de *Pyrococcus horikoshii* (Chivers & Tahirov, 2005). Comme il n'existe pas de caractérisation biochimique de PhNikR, nous n'en parlerons que pour des comparaisons avec Ec et HpNikR.

Chez *E.coli* et *H.pylori*, le nickel est essentiel pour le bon fonctionnement d'enzymes comme l'hydrogénase à NiFe et l'uréase qui sont des facteurs de virulence.

Toutefois sa concentration doit être contrôlée sous peine de toxicité cellulaire. Ce contrôle dépend de NikR.

Les protéines de cette famille sont constituées de deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN avec un motif ruban-hélice-hélice et un domaine de tétramérisation (dimérisation de deux dimères) au niveau duquel se situe le site métallique dit de « haute affinité ». Seule NikR métallée se lie à l'ADN. Cette liaison entraîne soit la répression de la transcription des gènes soit l'activation (Abraham *et al.*, 2006; Chivers & Sauer, 1999; Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002; Contreras *et al.*, 2003; De Pina *et al.*, 1999; Schreiter *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2002).

Les propriétés connues jusqu'à présent des protéines NikR d'*Escherichia coli* et d'*Helicobacter pylori* vont être détaillées puisqu'elles sont essentielles à la compréhension de ce travail. Il est clair que de nombreuses caractéristiques, qui vont être présentées, ont été décrites alors que ce travail de thèse était en cours.

I.3. NikR chez *Escherichia coli*

Le gène *nikR* (anciennement nommé *yhhG*) de *E. coli* a été localisé et isolé en 1999 (De Pina *et al.*, 1999) à la suite d'une étude portant sur l'expression de l'opéron *nik* en présence de nickel. Cet opéron de 5 gènes code pour une protéine périplasmique ainsi qu'un transporteur de type ABC du nickel. A haute concentration de nickel l'expression de ce système de transport est réprimée par NikR, présente à une concentration d'environ 200 nM chez *E. coli* (Chivers & Sauer, 2002). Dans la même période, il a été montré que NikR appartenait à une famille de facteurs transcriptionnels de type Arc ayant un motif Ruban-Hélice-Hélice pour lier l'ADN (Chivers & Sauer, 1999). Les caractéristiques de EcNikR, régulateur transcriptionnel, vont être présentées.

I.3.1. La séquence protéique de EcNikR

Le gène *nikR* de *E. coli* code pour une protéine de 15094 Da contenant 133 acides aminés. Cette protéine présente de nombreux résidus pouvant être de potentiels ligands des métaux tels que les histidines qui sont au nombre de 12.

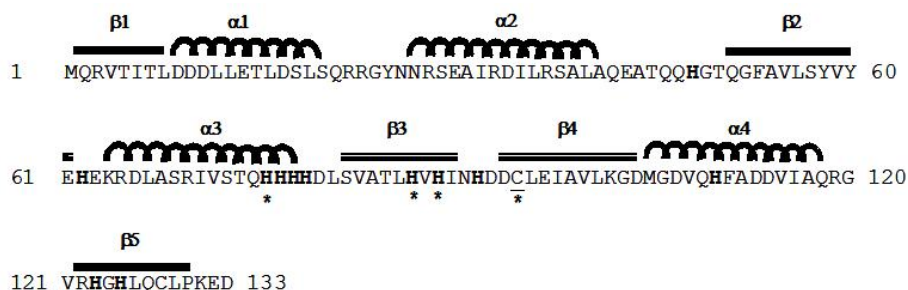


Figure I.23 Séquence protéique de NikR de *E.coli*. En gras sont indiquées les histidines, les cystéines sont soulignées. Les étoiles précisent les ligands du site de haute affinité. La structure secondaire de la chaîne D d'EcNikR apo décrite lors de la résolution de la structure cristallographique par rayon X (Schreiter *et al.*, 2003).

L'alignement de 8 séquences de protéines NikR montre que certains acides aminés sont très conservés parmi les espèces dont les quatre ligands du site métallique dit de haute affinité chez EcNikR (His 76', His 87, His 89, Cys 95).

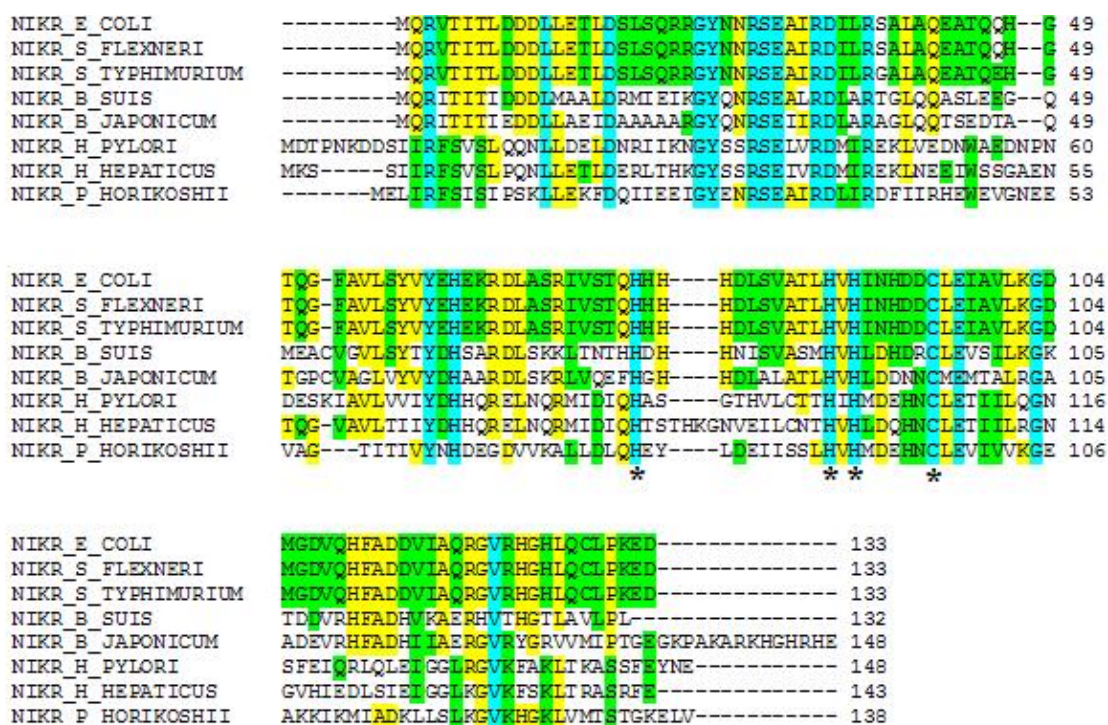


Figure I.24 Alignement d'une sélection de séquences des protéines NikR de différents micro-organismes. Les acides aminés en bleu sont parfaitement conservés, en jaune sont conservés au moins à 60% et en vert à plus de 25 %. Les étoiles précisent les ligands du site de haute affinité de EcNikR.

I.3.2. Liaison du métal

Les premières purifications de EcNikR sauvage ont révélé son aptitude à lier du nickel avec une forte affinité. En effet la première étape de purification consistait en une colonne d'affinité chargée en nickel (Ni-NTA). D'après Chivers et Sauer, EcNikR ne pouvait pas se lier directement à cette colonne car elle chélatait son métal (Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002). La constante de dissociation des groupements NTA pour le Ni(II) est pourtant de 3pM (Dawson *et al.*, 1986). Ce comportement a laissé suggérer que NikR présentait un site de haute affinité pour lier le nickel. Pour remédier à ce comportement, l'ajout d'un excès de nickel supplémentaire au tampon de charge semblait nécessaire pour permettre sa liaison à la colonne *via* des sites à nickel de plus basse affinité. Cette étape, comme nous le verrons par la suite, n'est pas nécessaire pour la purification d'EcNikR.

La protéine, purifiée en présence d'une surcharge en Ni(II), était métallée. La chélation par l'EDTA du nickel est permise par l'exposition de la protéine à cet agent sur des temps longs allant de 12 heures à plusieurs jours à température ambiante (Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002).

I.3.2.1. Site de haute affinité

Le site métallique dit de haute affinité de EcNikR a été caractérisé par des techniques de spectroscopie (XAS, XANES, EXAFS, UV-Vis) (Carrington *et al.*, 2003; Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002; Leitch *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004) ainsi que lors de la résolution de la structure cristallographique du domaine de tétramérisation (Schreiter *et al.*, 2003).

Ce site présente une géométrie plan carré où le nickel est coordonné par 4 ligands provenant de deux unités monomériques (Schreiter *et al.*, 2003) : His 87, His 89, Cys 95 d'une première sous-unité et His 76' d'une seconde sous-unité adjacente. Lors de leur étude en 2003, Carrington *et al.* avaient proposé que le résidu Glu97 soit le quatrième ligand du site à la place de His 76. Il s'avère en fait que ce résidu est impliqué dans le réseau de liaison hydrogène qui stabilise le site de haute affinité et qui interagit avec His 87 (Schreiter *et al.*, 2003).

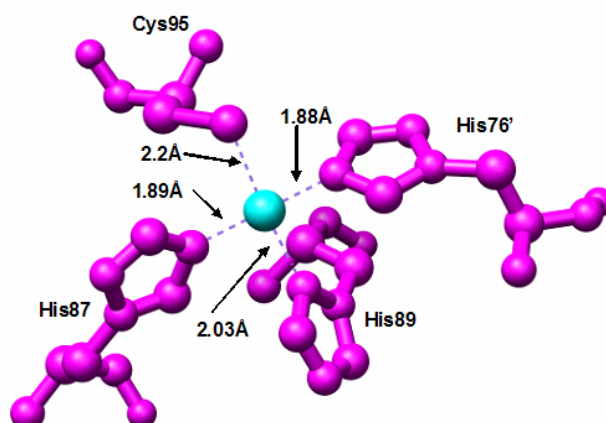


Figure I.25 Ligands du site de haute affinité d'EcNikR ; His 87, 89 et Cys 95 proviennent d'une première unité monomérique et His 76' provient d'une seconde sous-unité adjacente.

La liaison du nickel dans ce site peut être suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible. Des bandes caractéristiques sont notables sur les spectres : une bande de transfert de charge entre le groupement thiolate de la cystéine et le nickel (bande à 302 nm) ainsi que des bandes d-d de faibles intensités (460 et 570 nm) (Chivers & Sauer, 2000). Ce site lie jusqu'à 1 équivalent de nickel ajouté par monomère. EcNikR a donc quatre sites de haute affinité (1/monomère). L'affinité de ce site pour le nickel (Tableau I-10) a été déterminée en utilisant un dosage indirect avec de l'EGTA. La technique employée pour cette détermination fera l'objet d'une discussion dans les résultats exposés par la suite.

EcNikR présente des affinités proches pour d'autres ions métalliques divalents (cobalt, cuivre, zinc et cadmium) (Tableau I-10). Toutefois seul le nickel confère une réelle stabilité conformationnelle à la protéine (Dias & Zamble, 2005; Wang *et al.*, 2004).

Métal	Stoechiométrie de liaison	Kd du site de haute affinité (M)	$\lambda_{\text{max LMCT}}$ (nm) [ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)]	Technique pour le dosage par compétition
Ni(II)	1 Ni/monomère	$1 - 7 \cdot 10^{-12}$	302 [3200-7200]	EGTA
Cu(II)	1 Cu/monomère	$1.4 \cdot 10^{-17}$	388 [4450]	EGTA, EDDA
Co(II)	1 Co/monomère	$2 \cdot 10^{-9}$	307 [1100]	Fura-2
Zn(II)	1 Zn/monomère	$< 1 \cdot 10^{-12}$	-	PAR
Mn(II)	Peu liaison	ND	-	-

Tableau I-10 Liaison de métaux de transition par EcNikR, caractéristiques de la liaison (Constante de dissociation Kd, la longueur maximale de la bande de transfert de charge et le coefficient d'extinction molaire, technique employée pour le dosage par compétition (ND : non déterminé)) (Chivers & Sauer, 2002; Wang *et al.*, 2004).

La géométrie et la coordination des sites dits de haute affinité liant les différents ions métalliques ont été étudiés récemment par XANES et EXAFS (Leitch *et al.*, 2007) :

- Pour le nickel : Le site implique bien 4 ligands et présente une géométrie plan carré
- Pour le cuivre : Le site présente également une géométrie plan carré, et le métal est tétracoordonné avec 2 imidazoles, 1 ligand N/O et 1 ligand S.
- Pour le zinc : le site présente une géométrie tétraédrique, le métal est tétracoordonné avec 3 imidazoles et 1 ligand S.
- Pour le cobalt : la géométrie du site et sa coordination diffèrent de celles prédites lors des mesures faites en UV-Visible où une bande de transfert de charge à 307 nm avait été observée et prédisait la présence d'une cystéine dans la sphère de coordination du Co(II) (Wang *et al.*, 2004). Le site aurait une géométrie octaédrique et impliquerait 3 imidazoles et 3 ligands N/O. Il n'y aurait pas de soufre. Le site à cobalt serait très différent du site initial à nickel ce qui est assez surprenant.

La géométrie du site à nickel en présence d'ADN a également été étudiée. Des premiers travaux ont proposé qu'elle serait très différente en présence d'ADN. La géométrie serait octaédrique et impliquerait 6 ligands N/O, la liaison avec la cystéine serait rompue (Carrington *et al.*, 2003). Ces données ont été remises en question à deux reprises (Leitch *et al.*, 2007; Schreiter *et al.*, 2006) et plus particulièrement lors de la résolution de la structure cristallographique du complexe ADN-EcNikR-Ni par Schreiter *et al.* en 2006. Ce site à nickel conserverait en fait ses ligands de coordination avec une géométrie plan carré où la structure serait légèrement distordue.

I.3.2.2. Sites dits de basse affinité

La présence de sites dits « de basse affinité pour le métal » a été suggérée à la suite d'études portant sur la liaison d'EcNikR à l'ADN où un excès de Ni(II) en EMSA était nécessaire à la fixation maximale de la protéine à l'ADN (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002). Le Kd de ces sites pour le nickel variaient entre 30nM et 30μM selon les études considérées. L'analyse de la séquence d'EcNikR a permis de proposer des ligands potentiels pour lier le nickel dans les sites de basse affinité. Le cluster d'histidines H77, 78, 79 et 92' ainsi que le cluster composé des résidus H123, 125 et C128' ont été proposés comme sites potentiels (Bloom & Zamble, 2004). Des études récentes ont apporté des informations sur la nature de ces sites potentiels : l'étude structurale du complexe EcNikR-Ni-ADN en présence d'un excès de Ni(II) (Schreiter *et al.*, 2006) et l'étude par spectroscopie d'absorption des rayons X (Leitch *et al.*, 2007). Ces différents travaux seront présentés par la suite (I.3.3.3 p- 76 -).

I.3.3. Caractéristiques structurales

Les caractérisations biochimiques et biophysiques des domaines N-ter (résidus 1 à 47 couplés à un tag de 6His), C-ter (résidus 48 à 133) ainsi que de la protéine native ont permis de mettre en évidence qu'EcNikR est un tétramère ou plus exactement un dimère de dimère (Chivers & Sauer, 1999; Chivers & Sauer, 2002). La structuration des domaines N-ter et C-ter a lieu indépendamment. Les domaines N-ter, riches en hélice α (56%), s'homodimérisent ; la constante de dissociation du dimère en monomère est de $9,9.10^{-11}$ M (Chivers & Sauer, 1999). Les domaines C-ter, quant à eux, forment un homotétramère en présence ou en absence de métal. La liaison du nickel dans les sites métalliques modifie la structure secondaire de la protéine native ainsi que du domaine C-ter en augmentant le pourcentage d'hélice alpha comme cela a été observé en CD (Chivers & Sauer, 2002).

Ces premières caractéristiques structurales ont été confirmées lors de la résolution par diffraction des rayons X des structures tridimensionnelles de la protéine EcNikR apo (résolution : 2.3Å (Schreiter *et al.*, 2003)) (Figure I.26) et plus récemment d'EcNikR métallée (résolution : 2.1Å (Schreiter *et al.*, 2006)) (Figure I.27). Ces différentes structures vont être présentées.

I.3.3.1. Structure de la protéine EcNikR apo

Une sous unité monomérique de cette protéine tétramérique comprend deux domaines (Figure I.26B) :

- Le domaine N-ter impliqué dans la liaison à l'ADN. Il présente un repliement de type $\beta\alpha\alpha$ qui forme le domaine de liaison à l'ADN par dimérisation avec le domaine N-ter d'une seconde sous unité adjacente.
- Le domaine C-ter impliqué dans la tétramérisation ainsi que dans la métallation. Il présente un repliement de type $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ caractéristique des domaines ACT*. Ces domaines sont retrouvés dans de nombreuses protéines dont certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés et des purines. La liaison de petites molécules (acides aminés, Ni(II)...) dans ce domaine y est permise, elle tend à réduire la flexibilité structurale et semble corrélée à des mécanismes de régulation allostérique (Grant, 2006). Ces mécanismes restent à définir.

Chaque homodimère comprend un domaine de liaison à l'ADN, ainsi qu'un cœur constitué des domaines C-ter de chaque sous unité (Figure I.26A). Le tétramère est maintenu par des interactions hydrophobes ainsi que par des liaisons hydrogènes entre les brins $\beta 3$ des monomères adjacents à l'interface de tétramérisation. En absence de métal, l'hélice $\alpha 3$ est plus flexible et désordonnée, elle n'est d'ailleurs visualisée que sur une sous-unité monomérique. EcNikR apo fait approximativement 90 Å de long (distance entre chaque domaine de liaison à l'ADN). Dans cette conformation, EcNikR apo ne peut se lier à l'ADN.

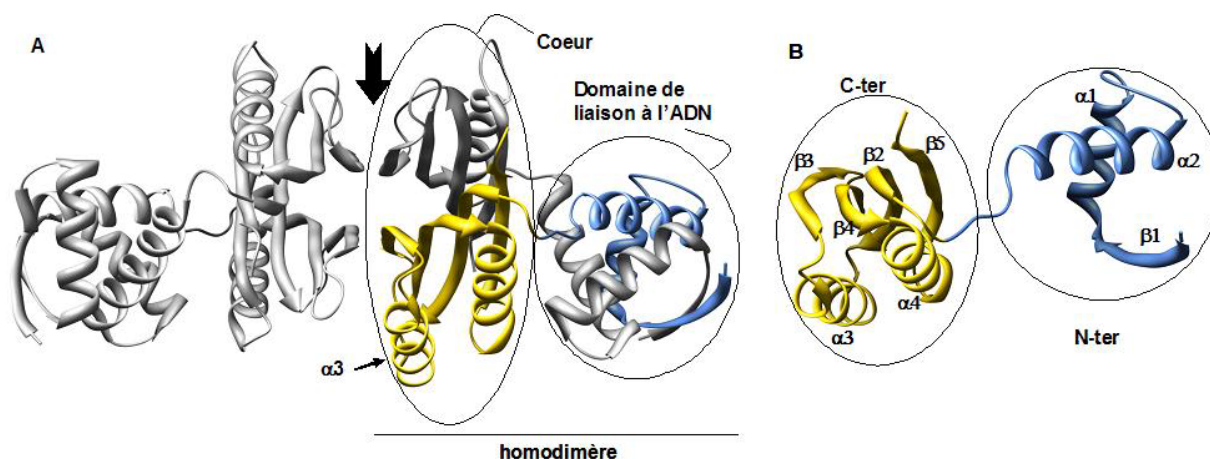


Figure I.26 Structure tridimensionnelle de EcNikR apo de résolution 2.3Å (Schreiter *et al.*, 2003). A) Structure entière B) Une sous-unité monomérique. Le domaine N-ter d'une sous unité monomérique avec le repliement ruban-hélice-hélice est en bleu et le domaine C-ter équivalent, avec un repliement caractéristique d'un domaine ACT, est en jaune. L'interface de tétramérisation est marquée par la flèche.

* ACT : Aspartate kinase-Chorismate mutase-TyrA (3 premières lettres de 3 enzymes ayant un tel domaine) ; Par exemple : l'aspartate kinase lie la lysine dans son domaine ACT.

I.3.3.2. Structure de la protéine EcNikR métallée

La résolution en 2003 de la structure du domaine de tétramérisation en présence de nickel a permis de décrire pour la première fois le site à nickel chez EcNikR ainsi que de comprendre les changements structuraux observés en dichroïsme circulaire. Les changements structuraux touchent essentiellement l'hélice $\alpha 3$ ainsi que la boucle entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$. L'hélice $\alpha 3$ qui contient un des ligands du site de haute affinité H76, se voit ordonnée dans chaque C-ter. Les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ d'une même sous-unité monomérique, quant à eux, contiennent les 3 autres ligands du site métallique adjacent. La liaison du nickel dans le site de haute affinité entraîne un mouvement au niveau de la boucle liant les deux brins afin de les rapprocher et donc rapprocher les ligands pour former les sites (Figure I.27C). La chaîne latérale de His 89 subit un déplacement de 2.6 Å.

Ces observations ont été confirmées et complétées lors de la résolution en 2006 de la structure complète d'EcNikR métallée (Figure I.27A et C) (Schreiter *et al.*, 2006).

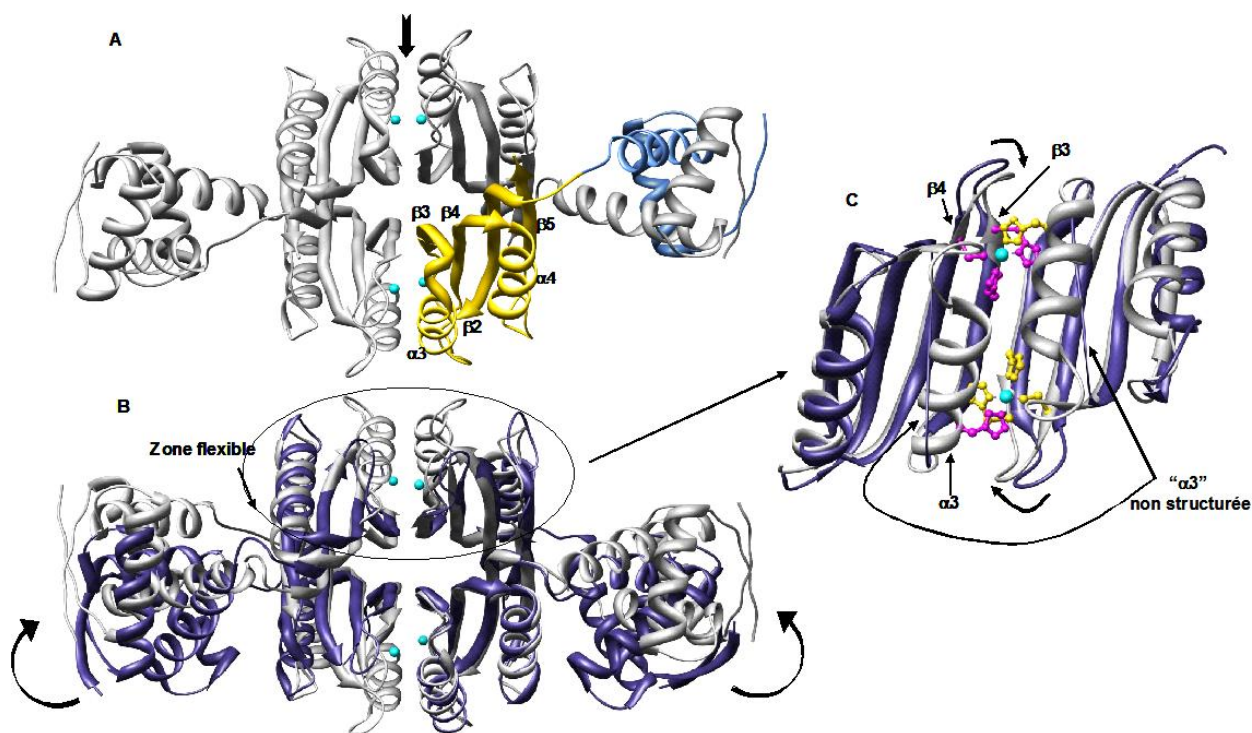


Figure I.27 Structures tridimensionnelles de EcNikR métallée et apo (Schreiter *et al.*, 2003; Schreiter *et al.*, 2006). A) Structure d'EcNikR métallée de résolution 2.1 Å, l'interface de tétramérisation est visualisée par la flèche↓, les éléments de la structure secondaire ont été précisés. B) Superposition d'EcNikR apo (bleu foncé) et d'EcNikR métallée (gris clair). C) Deux domaines ACT d'EcNikR métallée et apo, visualisation du mouvement de la boucle entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ lors de la métallation. L'hélice $\alpha 3$ non résolue d'EcNikR apo est représentée par la ligne.

La structure d'EcNikR métallée est comparable à celle d'EcNikR apo et du domaine de tétramérisation métallé.

Toutefois l'orientation des domaines de liaison à l'ADN par rapport au domaine de tétramérisation est différente (Figure I.27B). Ce positionnement suggère que ces deux domaines « rigides » se déplacent l'un par rapport à l'autre grâce au domaine de liaison flexible qui les lie (résidus 41-52). Cette flexibilité relative, observée en absence d'ADN, est en accord avec les structures décrites pour NikR de *Pyrococcus horikoshii* (PhNikR). PhNikR peut adopter plusieurs conformations : Ouverte ou Fermée avec un positionnement Trans ou Cis (modèle) des domaines de liaison à l'ADN (Figure I.28) (Chivers & Tahirov, 2005).

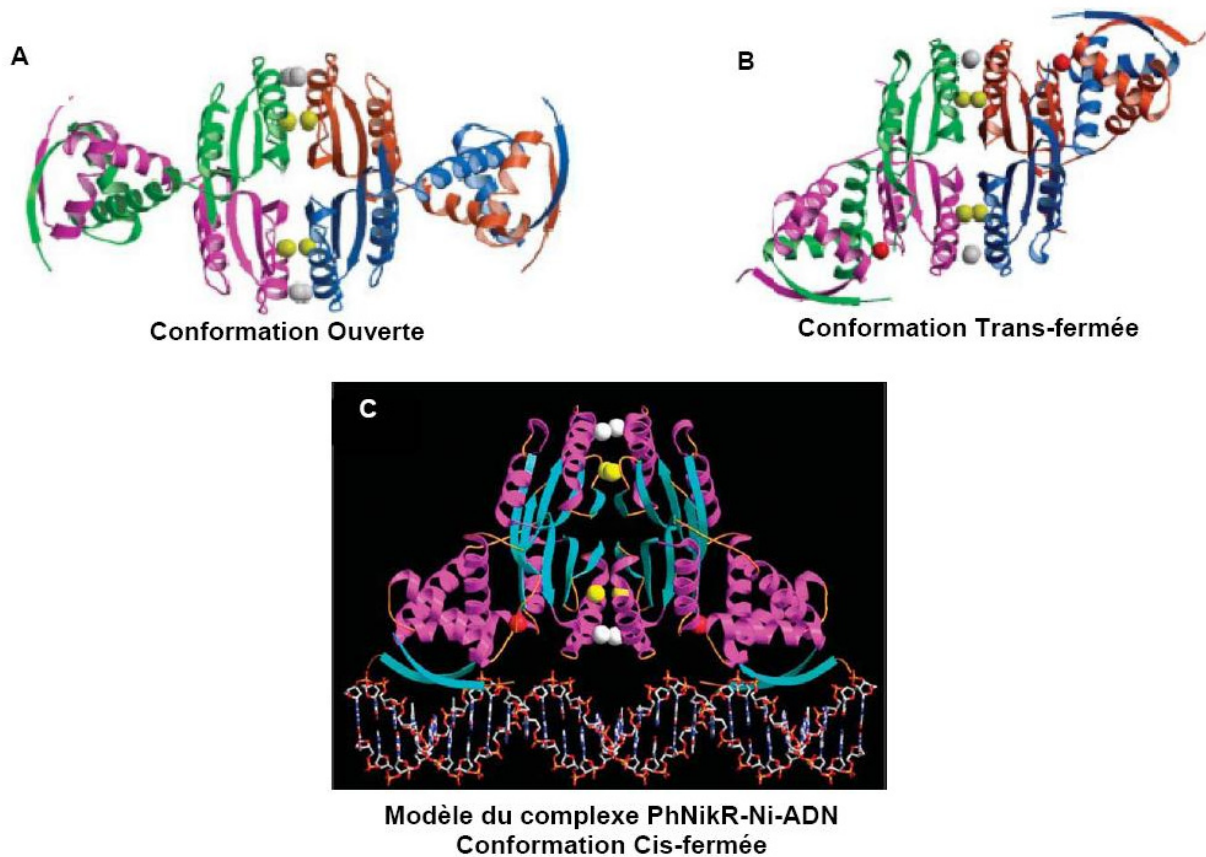


Figure I.28 Structures tridimensionnelles de PhNikR métallée (A : conformation ouverte, B : conformation Trans-fermée) et modèle du complexe PhNikR-Ni-ADN (C). Trois classes de sites à Ni(II) ont été proposées, ● Ni(II) dans le site de haute affinité, ○ Ni(II) dans le site auxillaire et ● Ni(II) dans le site dit de basse affinité. Structures tirées de (Chivers & Tahirov, 2005).

Par ailleurs, la résolution de différentes structures cristallographiques de PhNikR, qui comprend aussi un site dit de haute affinité, a permis de décrire deux autres catégories de sites potentiels à nickel (Chivers & Tahirov, 2005). Le premier site décrit a été qualifié de site auxillaire. Il se situe à l'interface de tétramérisation et implique 3 résidus : His64, Asp65 et Asp 75'. Cependant les résidus Asp65 et Asp75' ne sont pas conservés parmi les espèces. Ce site ne serait donc pas caractéristique des protéines NikR. Le second site décrit se situe entre le domaine N-ter et le domaine C-ter. Le nickel serait coordonné au minimum par les résidus

Glu32 et Asp36 qui sont conservés parmi les espèces. Ce site qui présente une stoechiométrie de 1 Ni(II) par dimère, n'a été visualisé qu'après un trempage des cristaux dans du nickel. Il confère à la protéine une conformation originale qualifiée de trans-fermée.

Ces sites n'ont pas été observés dans la structure d'EcNikR métallée. Cependant un site équivalent liant du K⁺, situé entre le domaine N-ter et C-ter, a été noté lors de la résolution de la structure du complexe EcNikR-Ni-ADN comme nous allons le voir.

I.3.3.3. Structure du complexe EcNikR-Ni-ADN

Récemment, la résolution à 3.1 Å de la structure tridimensionnelle du complexe EcNikR-Ni-ADN (Schreiter *et al.*, 2006) a permis de décrire un nouveau site métallique et de confirmer la conformation « cis-fermée » adoptée par EcNikR métallée pour se lier à l'ADN (Figure I.29). Un tel modèle de liaison avait été proposé auparavant pour la liaison de PhNikR-Ni à l'ADN (Figure I.28C) (Chivers & Tahirov, 2005).

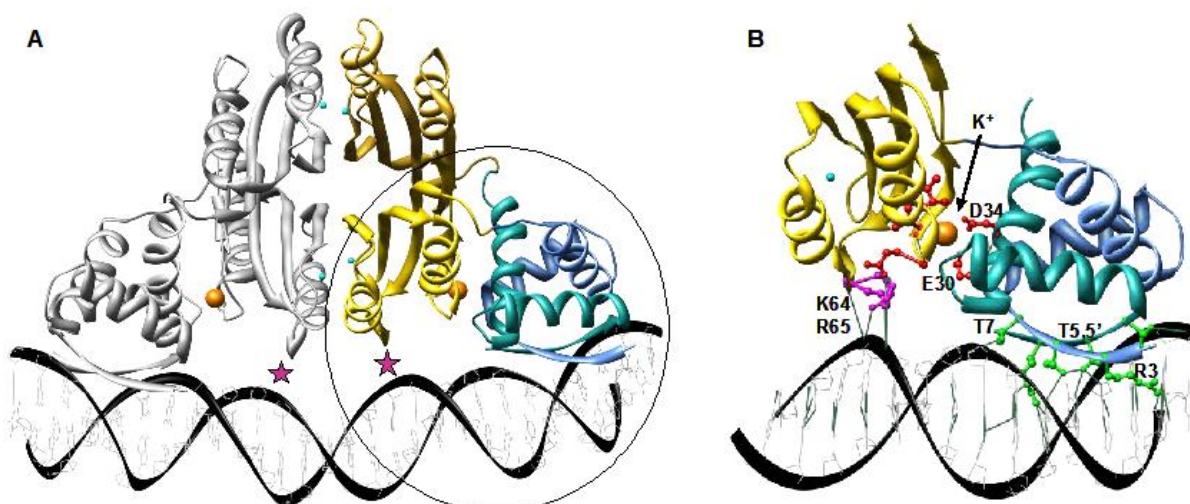


Figure I.29 Structure tridimensionnelle du complexe EcNikR-Ni-ADN de résolution 3.1 Å (A) (Schreiter *et al.*, 2006) et agrandissement du domaine de liaison à l'ADN (B). ADN : 30pb du promoteur *pnik*. En bleu : Domaine de liaison à l'ADN d'un dimère, les résidus **R3**, **T5** font des liaisons hydrogènes avec les bases du grand sillon; En jaune : Domaine de tétramérisation et liaison du Ni(II) ● ; Site à K⁺ ● : décrit entre le domaine Nter et Cter coordonné par les ligands **E30** et **D34**; En violet : des interactions entre les résidus **K64-R65** de α3 et l'ADN ★.

L'orientation des domaines de liaisons à l'ADN diffère significativement de celle observée pour la protéine apo ou métallée (Figure I.26A et Figure I.27A). Une rotation de ce domaine autour du domaine flexible réoriente les feuillets β antiparallèles leur permettant alors d'interagir avec le sillon principal de la séquence opératrice.

Différentes interactions entre EcNikR et la séquence opératrice ont été répertoriées :

- Interaction spécifiques : liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales de R3 et de T5 et des bases nucléotidiques.

- Interactions qualifiées de non spécifiques entre le domaine de liaison à l'ADN et les phosphates de l'ADN ainsi qu'entre le domaine de tétramérisation et l'ADN (interactions entre K64-R65 et les phosphates de l'ADN)

En présence d'ADN, un second site métallique est observé entre le domaine Nter et le domaine Cter. Il est analogue à celui décrit chez PhNikR à la différence près qu'il contient du potassium et non pas du nickel.

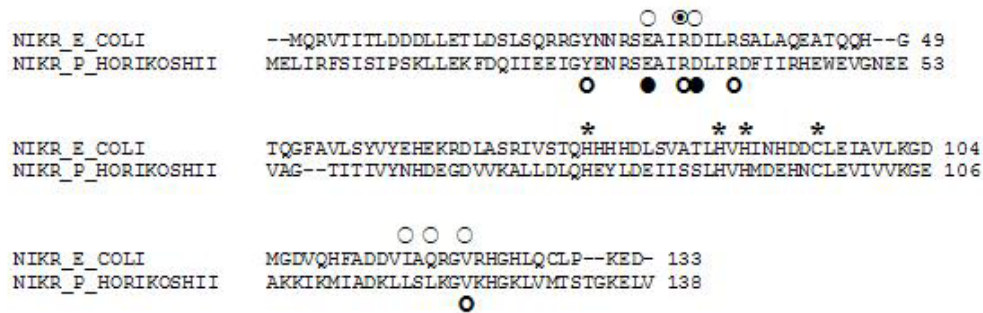


Figure I.30 Alignement des séquences de EcNikR et PhNikR sur lesquelles ont été précisés les ligands des sites de haute affinité * et de basse affinité à Ni(II) ● pour PhNikR et K⁺ ○ pour EcNikR. Les ligands stabilisateurs du site à Ni(II) et à K⁺ sont indiqués par ● et ○ respectivement.

Le potassium est coordonné par les résidus Glu30 et Asp34 (résidus conservés) du domaine N-ter ainsi que par l'oxygène du carbonyle de Ile116, Gln118 et Val121 du domaine de métallation (Figure I.30). Les deux résidus Glu30 et Asp34 semblent essentiels pour observer une liaison à l'ADN en gel retard (Schreiter *et al.*, 2006). Ce site à potassium semble nécessaire pour que EcNikR se lie à l'ADN. Mais il n'explique pas pourquoi un excès de nickel augmenterait l'affinité de la protéine pour l'ADN. En effet il n'est pas prouvé que le nickel puisse être lié dans un tel site et remplacer le potassium.

En effet, après un trempage des cristaux du complexe NikR-Ni-ADN dans une solution de nickel, d'autres sites ont été observés, mais aucun ne correspond au site à K⁺. Ces nouveaux sites sont au nombre de six, les ligands sont répertoriés dans le tableau suivant :

Site	Ligands impliqués
1	Met1
2	His125, His125'
3	His79, His92'
4	His78, His110, D114
5	His48
6	Asp104, Asp107

Tableau I-11 Les autres sites à nickel observés lors du trempage des cristaux du complexe NikR-Ni-ADN dans une solution de Ni(II) (Schreiter *et al.*, 2006).

L'effet de ces nickels ne serait pas structural mais plutôt électrostatique. Ils permettraient d'augmenter l'affinité de NikR pour l'ADN en augmentant la charge positive de la protéine (Schreiter *et al.*, 2006).

Récemment, la caractérisation d'un second site métallique par des techniques spectroscopiques (XANES, EXAFS) a été menée en présence d'ADN (Leitch *et al.*, 2007). Pour ce faire, une double métallation de la protéine a été réalisée, en considérant les affinités relatives de cette dernière pour les différents ions métalliques. La métallation du site de haute affinité d'EcNikR a dans un premier temps été faite avec du cuivre. La protéine ainsi métallée était ensuite mise à incuber avec l'ADN avant que du nickel ne lui soit ajouté en sous-stoechiométrie. Le second site dit de « basse affinité à nickel » présenterait une géométrie octaédrique et impliquerait 2 résidus imidazoles ainsi que 4 ligands N/O. Il a été proposé que ce site de basse affinité ne soit « correctement » formé qu'en présence d'ADN. La liaison de nickel dans le second site dit de basse affinité entraîne des modifications subtiles du site de haute affinité. Il existerait donc « une communication » entre les deux sites (Leitch *et al.*, 2007).

I.3.4. Mode d'action de la protéine

I.3.4.1. Généralités

EcNikR réprime l'expression transcriptionnelle des gènes de l'opéron *nik* en se liant sur une séquence opératrice constituée d'une dyade symétrique de 6 pb séparée par 16 pb (Chivers & Sauer, 2000). Cette séquence chevauche le promoteur *pnikA*. Le complexe métallé, une fois lié à sa séquence, empêche le positionnement de l'ARN polymérase et donc réprime la transcription.

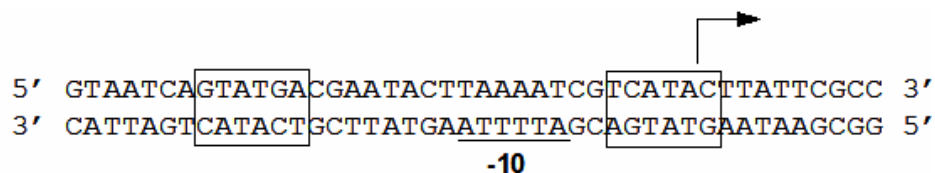


Figure I.31 Dyade symétrique de la région opératrice du promoteur *pnikA* liée par EcNikR métallée.

I.3.4.2. Activation de la protéine par le métal en présence d'ADN

In vivo, EcNikR est hautement spécifique du nickel (Leitch *et al.*, 2007). Par contre, *in vitro*, EcNikR peut lier la séquence opératrice en présence de différents ions métalliques (Ni(II), Cu(II), Co(II), Zn(II), Mn(II), Cd(II)) (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2000;

Chivers & Sauer, 2002). D'après des études faites par empreinte à la DNaseI, la liaison du nickel dans le site de haute affinité permet la liaison de la protéine à l'ADN avec une affinité moyenne ($K_d \sim 5-50$ nM). Cependant, en EMSA, le complexe 1:1 pour 1 tétramère:1 ADN n'a pas pu être observé dans ces conditions (Bloom & Zamble, 2004). Il a également été montré qu'en présence d'un excès de nickel (20-30 μ M), l'affinité de la protéine pour l'ADN était augmentée ($K_d \sim 10-20$ pM). Il a été proposé que la région protégée en empreinte à la DNaseI soit plus grande (Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002) mais ceci n'a pas été confirmé (Bloom & Zamble, 2004).

Un comportement similaire (meilleure affinité pour l'ADN) a été observé avec d'autres ions métalliques même si les K_d sont moins bons. Ces derniers sont récapitulés dans le Tableau I-12 :

Métal divalent Me(II)	A : 1 équ. Métal / monomère K_d_{ADN1} Empreinte à la DnaseI	B : Excès de métal K_d_{ADN2} EMSA	B : 1 équ. Ni(II) / monomère + Excès de métal K_d_{ADN3} EMSA	Rapport K_d_{ADN2} / K_d_{ADN3}
Ni(II)	5-50 nM	20 pM	20 pM	1
Cu(II)	3 nM	600 pM	80 pM	7.5
Co(II)	11 nM	1.4 nM	0.5 nM	2.8
Zn(II)	270 nM	agrégation	-	-
Mn(II)	NB	2.4 nM	0.5 nM	5

Tableau I-12 Constante de dissociation d'EcNikR métallée à l'ADN déterminée par diverses méthodes. A : Empreinte à la DNaseI, la protéine est incubée en présence d'1 équivalent de métal par monomère. B : EMSA, le gel et le tampon de migration contient 35 μ M du métal étudié (Bloom & Zamble, 2004) (NB : aucune liaison observée).

Le fait qu'un excès de métal puisse augmenter l'affinité de la protéine pour l'ADN a été attribué à la présence des sites métalliques annexes de basse affinité précédemment décrits (I.3.2.2 p - 72 - & I.3.3.3 p- 76 -).

L'importance du site de haute affinité à nickel dans la sélectivité ionique a été mesurée au travers d'une étude complémentaire en EMSA où différents ions métalliques étaient associés (Ni(II) dans le site de haute affinité et un excès d'ions métalliques pendant la migration). De nouveau une augmentation de l'affinité de la protéine pour l'ADN a été mesurée. La liaison du Ni(II) dans son site de haute affinité assurerait alors une certaine sélectivité et induirait des changements conformationnels propres (Bloom & Zamble, 2004). Des expériences, très récentes, d'échange H/D analysées par spectrométrie de masse ont confirmé cette hypothèse. Les temps des échanges H/D entre EcNikR-Co(II), EcNikR-Zn(II) et EcNikR apo sont similaires et différent de ceux mesurés pour EcNikR-Ni(II) et EcNikR-Cu(II) (Leitch *et al.*,

2007). Ces données suggèrent que la protéine, selon la nature du métal (Zn(II)/Co(II) ou Ni(II)/Cu(II)), adopte une conformation différente.

Il a également été proposé que le second site de métallation soit plus sélectif du nickel (Bloom & Zamble, 2004). Il semblerait qu'une communication entre le site de haute affinité et le second site soit établi.

Les mesures faites par empreinte à la DNase I ou par EMSA ont révélé que la liaison à l'ADN devait être coopérative (facteur de Hill >1) (Bloom & Zamble, 2004). Cette coopérativité positive a été attribuée à la liaison du métal par différents sites. Cependant un tel facteur a également été mesuré lorsque seul un équivalent de métal (Ni(II) ou autre) était ajouté. La liaison du métal, couplé à la liaison à l'ADN ne doit pas s'effectuer si simplement.

I.3.4.3. Mécanisme d'activation de la protéine

Plusieurs mécanismes d'activation d'EcNikR peuvent être proposés au regard des données concernant les caractérisations structurales d'EcNikR et de PhNikR ainsi que l'activation de la protéine par le métal en présence d'ADN. Ils sont représentés dans la [Figure I.32](#).

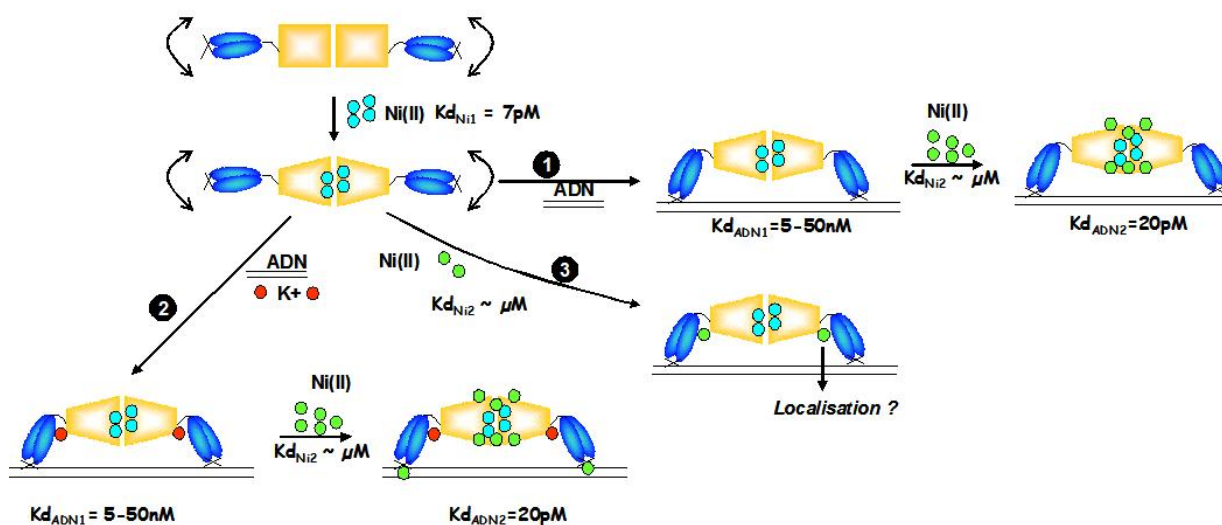


Figure I.32 Mécanismes d'action d'EcNikR en présence de métal et d'ADN. ❶ : Mécanisme proposé suite aux études de liaison à l'ADN (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2002) ; ❷ : Mécanisme proposé suite à la résolution de la structure du complexe EcNikR-Ni-ADN (Schreiter *et al.*, 2006); ❸ : Mécanisme proposé lors de l'étude de Leitch *et al.* en 2007. ● Ni(II) du site dit de haute affinité, ● Ni(II) des sites secondaires.

EcNikR présente à l'état de tétramère ne peut lier l'ADN en absence de métal. La liaison du nickel dans son site de haute affinité induit des changements conformationnels au sein du domaine de tétramérisation. Le domaine de liaison à l'ADN présente une grande flexibilité. EcNikR peut adopter différentes conformations. La liaison du Ni(II) uniquement dans le site

de haute affinité permet d'observer une liaison dite de moyenne affinité à l'ADN. La présence d'un large excès de métal conduirait à une meilleure affinité de la protéine pour l'ADN.

Il semblerait que la liaison d'un K^+ dans un second site qui serait présent entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de tétramérisation, ou d'un second nickel, stabiliserait le domaine de liaison à l'ADN dans une conformation dite « Cis » favorable à la liaison à l'ADN. Ce site à potassium ou à nickel semble nécessaire pour que NikR puisse se lier à l'ADN. L'excès de métal augmenterait l'affinité de NikR pour l'ADN en augmentant la charge positive de la protéine. Un autre rôle sera proposé pour l'excédent de métal lors de l'étude des propriétés d'EcNikR dans le Chapitre II.

I.3.5. NikR et l'homéostasie du nickel chez *E. coli*

Escherichia coli a besoin de nickel pendant qu'elle croît en anaérobiose afin d'assurer l'expression, la maturation et l'activation de son pool d'hydrogénases à NiFe. Les hydrogénases sont au nombre de quatre (Hyd 1 à 4), cependant seules les expressions de Hyd 1 (codée par les gènes *hya*), de Hyd 2 (gènes *hyb*) et de Hyd 3 (gènes *hyc*) ont été observées *in vivo*. Hyd 1 et 2 assurent l'oxydation de H_2 en présence de fumarate (accepteur d'électrons) pour générer de l'ATP. Hyd 3, quant à elle, constitue le dernier élément de la voie formiate hydrogène-lyase présente durant la croissance fermentative. Cette voie catalyse l'oxydation du formiate en CO_2 et en H_2 .

Les hydrogénases à NiFe ne sont pas les seules enzymes qui requièrent du nickel pour leur activité chez *E. coli*. En effet cette dernière possède également une glyoxalase (Glx I) qui est Ni-dépendante (Clugston *et al.*, 1998; Clugston *et al.*, 2004). Elle est impliquée dans une des voies de dégradation du méthylglyoxal, métabolite toxique pour la bactérie.

Malgré la nécessité pour la bactérie d'avoir un pool de nickel cytoplasmique, il peut aussi se révéler toxique pour cette dernière, puisqu'une concentration intracellulaire trop importante peut entraîner divers événements :

- La catalyse, par le métal, de la formation d'espèces oxygénées réactives (Torreilles & Guerin, 1990; Torreilles *et al.*, 1990)
- La fixation non spécifique du nickel à des protéines (Chivers & Sauer, 2000)
- Le déplacement de métaux de leurs sites actifs (Chivers & Sauer, 2000)

Il lui est donc indispensable d'avoir des systèmes de contrôle et de régulation de sa concentration intracellulaire en nickel qui vont affecter son transport (importation et exportation) et son stockage.

Chez *E. coli*, aucune protéine n'a jusqu'à présent été identifiée comme protéine de stockage du nickel, à la différence de bactéries comme *Bradyrhizobium japonicum* qui possède la nickéline (ou HypB) (Olson *et al.*, 1997; Olson & Maier, 2000) ou encore *Helicobacter pylori* avec Hpn qui sera présentée par la suite. Il a toutefois été suggéré que SlyD qui participe à la maturation de l'hydrogénase puisse également jouer cette fonction (Leach *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2005).

Seul le transport du nickel semble être régulé chez *E. coli* (Figure I.33).

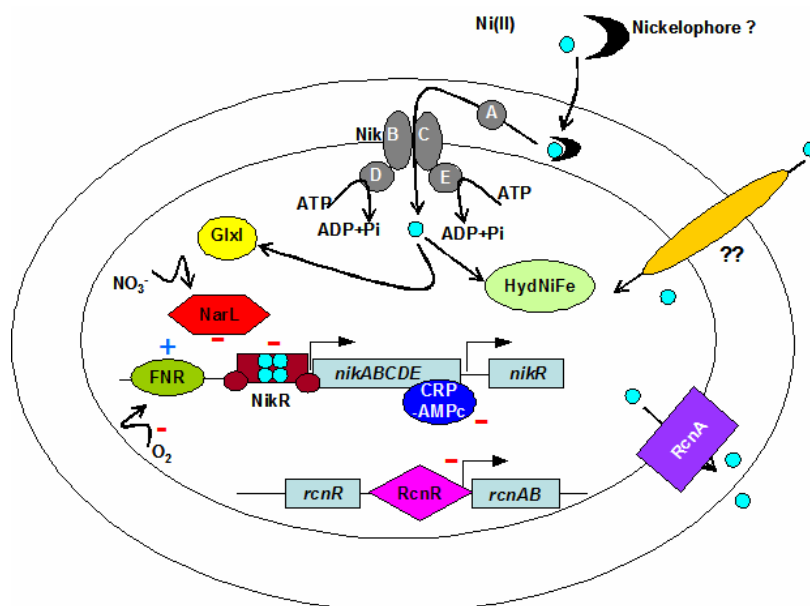


Figure I.33 Les différents partenaires de l'homéostasie du nickel (Cherrier *et al.*, 2005; De Pina *et al.*, 1999; Iwig *et al.*, 2006; Meier, 2005; Rodrigue *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 2005) : NarL phosphorylé, EcNikR-Ni réprime indépendamment l'expression transcriptionnelle de l'opéron *nik* dont les gènes codent pour le transporteur NikABCDE impliqué dans l'importation du nickel nécessaire à la maturation des hydrogénases à NiFe. FNR, en anaérobiose, active l'expression transcriptionnelle de l'opéron *nik*. L'existence d'un second importateur de nickel a été suggérée, cependant il n'a pas été identifié. RcnR réprime l'expression transcriptionnelle du gène *rcnA* codant pour le système d'efflux du nickel et du cobalt chez *E. coli*. L'expression du gène *nikR* par son promoteur serait sous la dépendance d'une répression catabolique par le glucose. Le régulateur global CRP couplé à l'AMPC, en déficience de glucose, se lierait à *pnikR* et réprimerait son expression. Il régulerait indirectement l'expression de l'opéron *nikABCDE* dépendant du promoteur *pnikA* (Meier, 2005).

I.3.5.1. L'importation du nickel

I.3.5.1.1. NikABCDE : transporteur de type ABC

L'importation du nickel, essentiel au bon fonctionnement de l'hydrogénase à NiFe d'*E. coli*, est assurée principalement par le transporteur de type ABC (ATP Binding Cassette) de la sous-famille 2, NikABCDE (Navarro *et al.*, 1993; Wu & Mandrand-Berthelot, 1986; Wu *et al.*, 1991).

Les gènes codant pour les protéines de ce transporteur sont organisés en opéron, l'opéron *nik*.

Le transporteur est constitué de 5 protéines :

- NikA : Protéine périplasmique à nickel
- NikB et C : Protéines transmembranaires qui formeraient un pore permettant le passage du nickel du périplasma au cytoplasme.
- NikD et E : Protéines cytoplasmiques associées à la membrane interne. Elles possèdent les motifs de Walker A (GX₂GXGKST) et B (h₄DEX₄LD où h est un résidu hydrophobique) ainsi que la séquence signature des transporteurs ABC (LSGG) (Linton & Higgins, 1998). Ces motifs sont impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP permettant de générer l'énergie indispensable au transport du Ni(II).

NikA d'*E.coli* est la seule protéine périplasmique caractérisée (biochimiquement et structuralement) qui lie du nickel avec une affinité pour ce métal allant de 100 nM à 10 µM selon les techniques employées (fluorescence (de Pina *et al.*, 1995), ITC (Heddle *et al.*, 2003)).

Suite à la résolution de la structure cristallographique de NikA métallée par deux groupes (Cherrier *et al.*, 2005; Heddle *et al.*, 2003), il a récemment été proposé que NikA ne lierait pas directement le métal mais plutôt un complexe « Ni(II)-nickelophore » (Cherrier, 2005) par analogie à des données existantes sur les sidérophores et le fer. Elle le transférerait ensuite à NikB et C.

Un autre aspect remarquable de NikA est son rôle dans la réponse chimiotactique négative de la bactérie vis-à-vis du nickel. Ce processus correspond à un déplacement des bactéries en réponse à la présence « d'agents chimiques » répulsifs ou attractifs. Cela nécessite l'intervention de protéines capables de détecter le signal chimique et d'adapter en conséquence, la mobilité du micro-organisme (Mowbray & Sandgren, 1998). Ce mécanisme est un autre moyen mis en place par la bactérie pour faire face à une éventuelle « toxicité » métallique. En effet, en présence de trop fortes concentrations de Ni(II), NikA interagirait avec la protéine membranaire Tar (protéine chimioréceptrice qui transduit les signaux aspartate, maltose et Ni(II)), ceci provoquerait *in fine* la "fuite" de la bactérie devant l'excès de nickel par un mécanisme de chimiotactisme répulsif (de Pina *et al.*, 1995).

I.3.5.1.2. Autres systèmes

Le Ni(II) peut également être importé dans la bactérie de façon non spécifique lorsque ce dernier est présent à de hautes concentrations dans le milieu extracellulaire par des transporteur du Mg(II) comme CorA.

Par ailleurs, il a été récemment proposé qu'un second transporteur de nickel existerait chez *E. coli*, afin que les protéines à nickel autres que les hydrogénases (NikR, RcnR) puissent assurer leur fonction lorsque le transporteur NikABCDE est inactivé (Iwig *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2005). Ce second transporteur, qui différerait de CorA, n'a pas encore été identifié mais pourrait éventuellement correspondre à un second transporteur non spécifique de Mg(II) de type MgtA.

I.3.5.1.3. La régulation de l'importation du nickel

L'importation du nickel se voit réguler *via* un contrôle de l'expression transcriptionnelle des gènes du transporteur NikABCDE.

La transcription de ces gènes est :

- soit activée directement par FNR (Fumarate Nitrate Regulator) en anaérobiose.
- soit réprimée directement par NarL phosphorylé du système à double composante NarLX de façon nitrate-dépendante (Rowe *et al.*, 2005).
- soit réprimée directement par NikR de façon Ni-dépendante (Chivers & Sauer, 2002; De Pina *et al.*, 1999). Curieusement, il a été décrit que l'activité de NikR, qui est Ni-dépendante, serait indépendante de l'activité de NikABCDE et serait inhibée par un ou plusieurs partenaires de la maturation de Hyd3 (Rowe *et al.*, 2005).
- soit activée indirectement par le régulateur CRP-AMPc qui réprime l'expression de NikR lors d'une carence en glucose (Meier, 2005).

I.3.5.2. L'exportation du nickel

I.3.5.2.1. RcnA : Système d'efflux du nickel et du cobalt

Récemment une protéine impliquée dans l'efflux du nickel et du cobalt, RcnA anciennement nommée YohM, a été décrite chez *E. coli* (Rodrigue *et al.*, 2005). RcnA, protéine de 274 résidus, serait une protéine membranaire (membrane interne) d'après l'étude du profil hydropathique. Elle comprendrait 6 segments transmembranaires. RcnA possède également un domaine central (résidus 121 à 146) riche en histidines (17 His sur 26 résidus).

Son mode d'action s'apparente à celui des protéines de la famille « Major Facilitator Superfamily » ou MFS telles que NreB ou NrsD bien que ces dernières n'exportent que du Ni(II). RcnA s'en distingue par sa structure puisque les protéines de la famille MFS sont composées de 12 segments transmembranaires et présentent un domaine riche en histidines en C-ter. RcnA partage également des similitudes avec les membres de la famille de perméases NiCoT qui comprennent 8 segments transmembranaires. Mais elle ne possède pas leur signature caractéristique dans le second segment transmembranaire (H-X₄-D-H) et est impliquée dans l'efflux du métal et non pas dans l'importation.

RcnA présente des caractéristiques à part entière qui font d'elle, le premier membre d'une nouvelle famille de transporteur à efflux du Ni(II) et du Co(II).

I.3.5.2.2. La régulation de l'exportation du nickel

L'exportation du nickel se voit régulée *via* un contrôle de l'expression transcriptionnelle du gène du transporteur RcnA par le répresseur RcnR (Iwig *et al.*, 2006). Ce dernier (anciennement nommé YohL) serait un homologue fonctionnel des protéines métallorégulatrices appartenant à la famille SmtB/ArsR. En absence de métal, RcnR lierait le promoteur *prcnA* et empêcherait le positionnement de l'ARN polymérase. En présence de nickel ou de cobalt, Ni- ou Co-RcnR ne se lierait plus à l'ADN et l'expression du gène codant pour la protéine d'efflux aurait lieu.

RcnR semble être le premier membre d'une nouvelle famille de protéine métallorégulatrice (Iwig *et al.*, 2006). D'après les prédictions de structure secondaire, RcnR comprendrait uniquement des hélices α . RcnR et les membres de la famille SmtB/AsrR partagent peu de similarités (séquences, structures secondaires).

L'expression transcriptionnelle de RcnA ne répond pas à la « loi du tout ou rien ». Il semblerait qu'une expression basale faible de *rcnA* puisse tout de même avoir lieu à des concentrations en nickel qui précèdent son induction (Iwig *et al.*, 2006). Lorsque le gène codant pour *rcnA* est délété, l'expression du promoteur *pnik* est diminuée de 50% en présence de moins de 10nM de Ni(II). Cette diminution a été expliquée par l'activation d'EcNikR par le métal. Par contre, lorsque le gène codant pour *rcnR* est délété, l'expression du promoteur *pnik* est augmentée de 50% en présence de moins de 10nM de Ni(II). Cette augmentation serait due à l'expression de RcnA. RcnA permettrait l'exportation du Ni(II) excédentaire et limiterait l'activité de NikR.

Cette expression de RcnA, lui permettrait d'entrer en « compétition » avec NikR pour la liaison du nickel et d'en moduler son activité de répresseur.

En parallèle de l'étude proposée par Iwig et al. en 2006, Koch *et al.* se sont également intéressés au système RcnRA et ont mis en avant un lien entre l'homéostasie de différents métaux (Ni(II), Co(II) et Fe(II)) chez *E.coli*. En effet ils ont montré que *rcnA* appartenait au régulon de FUR (Koch *et al.*, 2007). L'expression transcriptionnelle de *rcnA* serait induite en présence de Ni(II) et de Co(II) tandis que celle *rcnR* serait induite essentiellement par du Fe(II) de façon FUR-indépendante. L'expression transcriptionnelle de *rcnA* serait réprimée par RcnR et FUR métallée. Il existe donc une relation entre ces deux régulateurs. Cependant le mécanisme de répression n'est pas encore élucidé. D'après Koch *et al.*, RcnR ne se lierait pas sur *prcnA* en présence de métal ni même absence de métal. Cependant ces travaux ont été faits à partir de protéines présentant des tags (strep-tag) en N-ter ou en C-ter, ce qui pourrait expliquer la différence de résultat observée entre les travaux de Koch *et al.* et ceux d'Iwig et al. qui eux ont travaillé avec une protéine native.

I.3.5.3. *La régulation de l'homéostasie du nickel chez Escherichia coli*

Un mécanisme simplifié de la régulation de l'homéostasie du nickel est présenté dans la Figure I.34.

En anaérobiose, *E. coli* a besoin de nickel pour l'activation de ses hydrogénases à NiFe qui pourront générer du pouvoir réducteur (électrons à bas potentiel) pour permettre *in fine* la production d'énergie. L'importation du nickel est principalement faite par le transporteur NikABCDE, bien que l'existence d'un second transporteur soit proposée. L'expression transcriptionnelle des gènes *nik* est activée par le régulateur FNR. En parallèle de l'expression de *nikABCDE*, le régulateur NikR est lui-même synthétisé (Figure I.34 A). Ce dernier va « sentir » la concentration en nickel dans la bactérie et au-delà d'un certain seuil va réprimer l'expression de *nikABCDE* et donc empêcher l'importation du nickel (Figure I.34 C). Cependant l'action de NikR n'est pas unique pour réguler cette concentration en nickel puisqu'un système d'efflux à nickel/cobalt, RcnA, est également présent avec une expression basale même à faible concentration de nickel (Iwig *et al.*, 2006). Ce système d'efflux permettrait d'éliminer le nickel issu du turn-over des hydrogénases NiFe et donc de limiter l'action de NikR visant à réprimer l'importation du nickel et donc limiter l'activation des hydrogénases (Figure I.34 B). L'expression de ce système d'efflux RcnA est également régulée par RcnR et par FUR (Koch *et al.*, 2007). En surcharge de nickel, l'expression du

système d'efflux est induite et NikR réprime l'expression des gènes codant pour le transporteur NikABCDE (Figure I.34 C). Toutefois, le Ni(II) peut être importé de façon non spécifique *via* les transporteurs du Mg(II). La concentration intracellulaire de Ni(II) se voit régulée avec ces différents mécanismes mis en jeu.

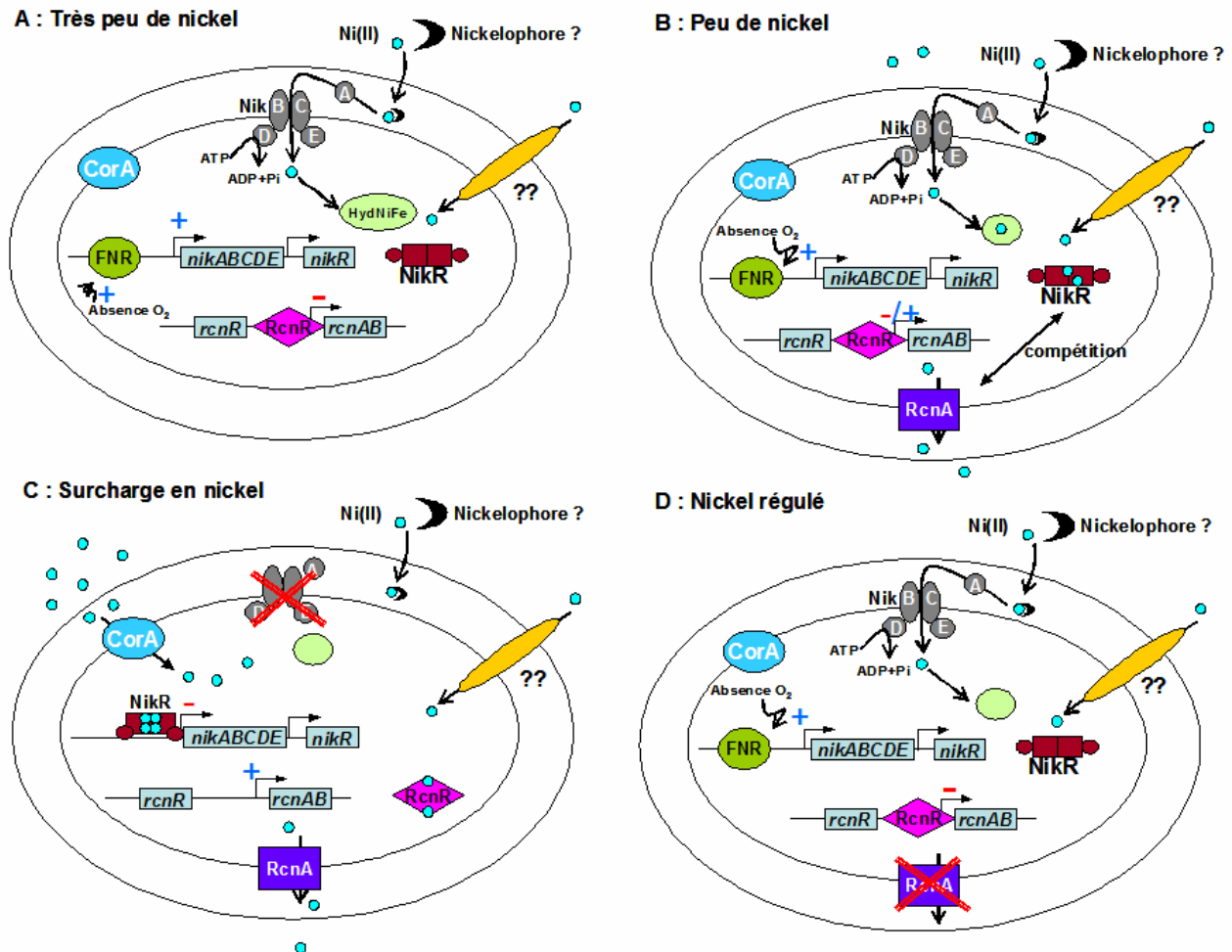


Figure I.34 La régulation de la concentration en nickel en anaérobiose par les régulateurs FNR, NikR et RcnR.

I.4. NikR chez *Helicobacter pylori*

Une protéine orthologue à EcNikR, avec 21% d'identité et 54% de similarité, est présente chez *H. pylori*, HpNikR. D'après la comparaison des séquences protéiques, HpNikR doit avoir des domaines de liaison du nickel et de liaison à l'ADN proches de ceux de EcNikR. La première étude se référant à l'action de HpNikR date de 2002. Cette protéine régule positivement la transcription des gènes (*ureAB*) codant pour l'uréase en présence de nickel (van Vliet *et al.*, 2002). De nombreuses études décrivant les fonctions de HpNikR au niveau microbiologique ont suivi. Elles mettent en avant son rôle de régulateur global chez ce microorganisme (Contreras *et al.*, 2003; Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005c; Wolfram *et al.*, 2006). HpNikR active et réprime la transcription de nombreux gènes en fonction du nickel.

Les caractérisations biochimiques et structurales sont plus récentes et ont été publiées en parallèle du travail présenté dans les Chapitres III et IV (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007; Delany *et al.*, 2005; Dian *et al.*, 2006; Dosanjh *et al.*, 2007).

I.4.1. La séquence protéique d'HpNikR

Chez *H. pylori*, la protéine NikR, codée par le gène *hp1338*, comprend 148 acides-aminés dont 7 histidines, 2 cystéines et 1 tryptophane (Figure I.35). Sa masse théorique est de 17147 Da.

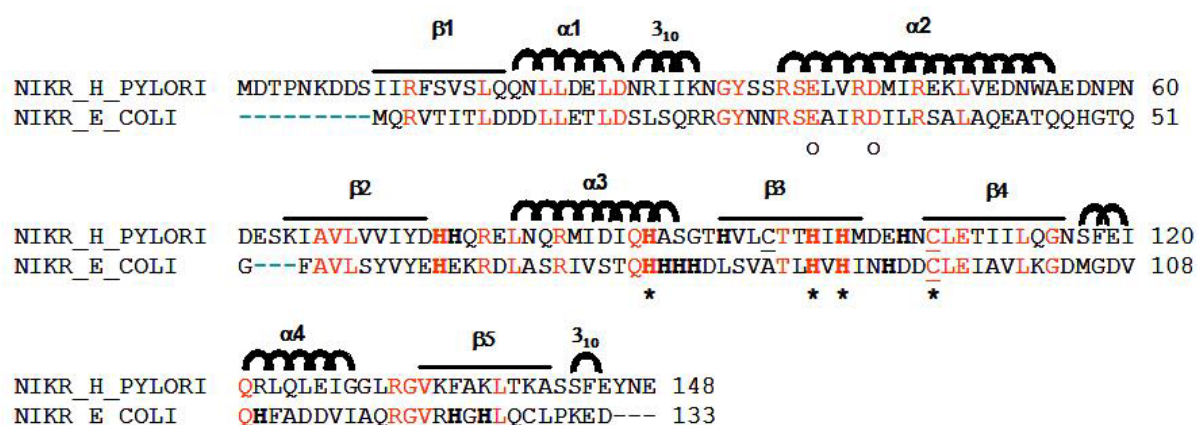


Figure I.35 Alignement des séquences protéiques d'HpNikR et d'EcNikR. La structure secondaire de la chaîne B d'HpNikR a été précisée d'après la structure RX (Dian *et al.*, 2006). En gras sont indiquées les histidines, les cystéines sont soulignées. En rouge sont précisés les résidus parfaitement conservés. Les étoiles précisent les ligands du site de haute affinité et les cercles correspondent à 2 ligands du site à K⁺ chez EcNikR. Ces différents ligands sont parfaitement conservés chez HpNikR

A la différence d'EcNikR, HpNikR présente en N-ter 9 résidus amino-acides supplémentaires (Figure I.35). Des extensions similaires adjacentes au motif RHH ont été décrites chez d'autres protéines membres de la famille RHH (Arc, Mnt, MetJ). La construction de protéines hybrides entre Arc et Mnt, a révélé que l'extension N-ter de Arc conférait à l'hybride Arc_{Nter}-Mnt_{Cter} la capacité de lier la séquence opératrice Arc alors que la protéine sauvage Mnt ne se lie aucunement à ce motif. Cette extension jouerait donc un rôle important dans la spécificité de reconnaissance de l'ADN (Knight & Sauer, 1989). Elle ne permettrait pas à elle seule la liaison à l'ADN. Ce motif peut de ce fait influencer les propriétés de liaison d'HpNikR à l'ADN par rapport à celles d'EcNikR.

La présence de 3 résidus supplémentaires dans la séquence d'HpNikR entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de tétramérisation est également notable.

Les ligands des sites métalliques chez EcNikR sont, quant à eux, parfaitement conservés chez HpNikR. Ces sites métalliques pourraient être identiques et conservés entre les espèces.

I.4.2. Caractéristiques générales

I.4.2.1. Propriétés biochimiques et biophysiques d'HpNikR

HpNikR, tout comme EcNikR, est un tétramère en solution (Delany *et al.*, 2005) qui lie du nickel. Son état oligomérique n'est pas modifié en présence de ce dernier. Il induit néanmoins des changements minimes au niveau de la structure secondaire (enrichissement en hélice α : 33% apo à 40% holo). Ces modifications n'ont aucune répercussion sur l'environnement du tryptophane (W54) qui reste plutôt exposé au solvant (338 nm), et n'améliorent pas la stabilité structurale d'HpNikR et ceci *a contrario* d'EcNikR (Dosanjh *et al.*, 2007).

HpNikR semble également sensible à l'oxydation, cette propriété s'exprime *via* la formation de ponts disulfures intermoléculaires entre les cystéines des différentes unités monomériques. Il est important de maintenir HpNikR à l'état réduit (Abraham *et al.*, 2006).

I.4.2.2. Liaison du métal par HpNikR

Les premiers protocoles de purification mis au point se sont basés sur la propriété de liaison métallique d'HpNikR. La première étape de purification consiste en une colonne d'affinité chargée en nickel (Ni-NTA). A la différence d'EcNikR, HpNikR ne décroche pas le métal de la colonne et se lie donc directement à cette dernière sans ajout supplémentaire de nickel. Ce comportement a laissé envisager que les sites métalliques et/ou que les affinités étaient différentes.

Pour HpNikR, tout comme pour EcNikR, la liaison du premier équivalent de nickel par unité monomérique peut être suivie par spectroscopie d'absorption UV-Visible ; deux bandes sont notables : une bande de transfert de charge à 302-305nm avec une forte intensité ($\epsilon_{302\text{nm}} = 6600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et une bande large à 475nm avec une faible intensité (bande d-d). Le spectre d'absorption de Ni-HpNikR est similaire à celui de Ni-EcNikR. L'affinité de ce site pour le nickel a été déterminée en utilisant une méthode indirecte (compétition avec de l'EGTA) : $K_{d\text{Ni}} = 3,5 \text{ pM}$.

Ce site a de nouveau été qualifié de site de haute affinité chez HpNikR (Abraham *et al.*, 2006). Il a été proposé que le Ni(II) de ce site soit coordonné par des résidus équivalents à ceux d'EcNikR soit His 88', His 99, His 101 et Cys 107 chez HpNikR dans le cadre d'une géométrie plan carré. Ceci a été confirmé grâce à la résolution de la structure par diffraction des rayons X (Dian *et al.*, 2006).

HpNikR peut également lier d'autres cations divalents comme le cuivre dans le site dit de haute affinité (Abraham *et al.*, 2006; Dosanjh *et al.*, 2007).

I.4.3. Caractéristiques structurales

Récemment trois structures d'HpNikR (apo-HpNikR, holo-HpNikR forme 1 et 2) ont été résolues par diffraction des rayons X (Dian *et al.*, 2006). Ces résolutions ont permis de confirmer les fondements structuraux des membres de la famille NikR ainsi que d'appréhender le cheminement du métal au sein de la protéine pour l'activer.

I.4.3.1. *Apo-HpNikR*

Apo-HpNikR présente un repliement similaire aux autres protéines NikR qui est organisé en deux domaines ([Figure I.36](#)) :

- Un domaine de liaison à l'ADN avec le motif ruban-hélice-hélice ($\beta_1\alpha_1\alpha_2$), la structure des 9 résidus de l'extension N-ter n'a pas été résolue (trop de flexibilité)
- Un domaine de tétramérisation avec un repliement de type $\beta_2\alpha_3\beta_3\beta_4\alpha_4\beta_5$ (repliement d'un domaine de type ACT (Grant, 2006))

En dépit d'un repliement similaire, sa conformation diffère de celle décrite pour apo-Ec et PhNikR (conformation ouverte). En effet apo-HpNikR présente une conformation transférée. Deux canaux à solvants sont observés à l'interface de tétramérisation et sont délimités par les hélices α_3 et les brins β_3 de chaque monomère. Ces brins β_3 sont essentiels puisqu'ils

interviennent dans la stabilisation de l'interface de tétramérisation par des interactions hydrophobes.

Des variations dans la structure quaternaire de apo-HpNikR ont également été observées. En effet les hélices α_3 sont ici bien structurées alors qu'elles ne le sont pas dans les formes apo de Ec et PhNikR (flexibilité). Cette même hélice et l'hélice α_4 ne présentent pas non plus le même positionnement dans la structure. Or elles sont impliquées dans l'interface de tétramérisation et dans les interactions entre les deux domaines de la protéine respectivement.

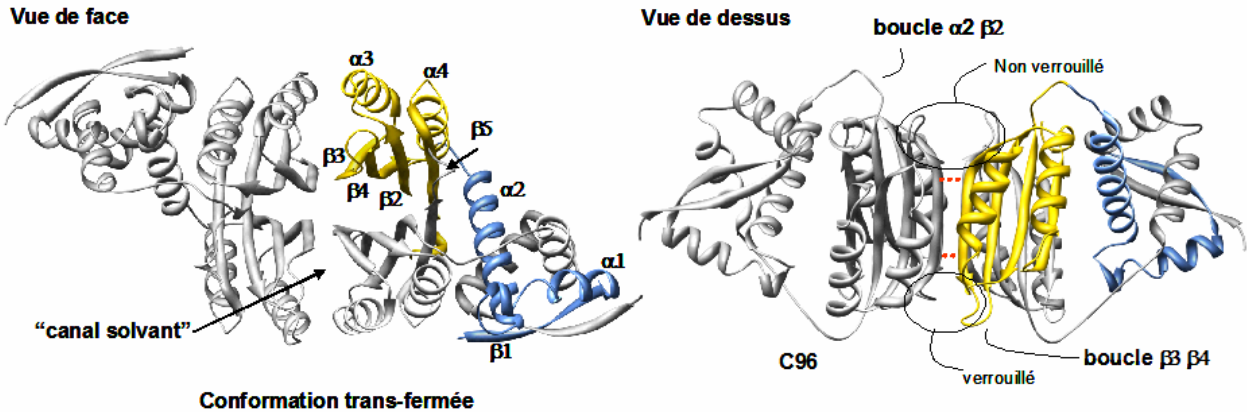


Figure I.36 Structure tridimensionnelle de Apo-HpNikR de résolution 2.1 Å en conformation trans-fermée avec une vue de face et de dessus pour mieux noter l'asymétrie des domaines de tétramérisation (Dian *et al.*, 2006). En bleu : Domaine de liaison à l'ADN d'une unité monomérique ; En jaune : Domaine C-ter impliqué dans la tétramérisation. En pointillés rouges sont précisés les cystéines 96.

Dans cette conformation trans-fermée, une organisation asymétrique des domaines de tétramérisation est notable : un côté de la protéine est dit « verrouillé », l'autre côté est dit « non verrouillé » (Figure I.36 Vue de dessus). Cette asymétrie est également mesurable *via* les distances entre les cystéines C96 des monomères présentes à l'interface de tétramérisation sur le brin β_3 (d_{s-s} verrouillé = 2.8 Å d_{s-s} non verrouillé = 3.7 Å) (Dian *et al.*, 2006).

I.4.3.2. Holo-HpNikR

Deux structures d'HpNikR métallée ont été résolues, après trempage avec du Ni(II), mettant en évidence différents sites métalliques. Certains cristaux ont été trempés dans 100mM de nickel (NiSO₄) aboutissant à une structure avec 3 types de sites métalliques (forme 1) (Figure I.37). Pour d'autres cristaux, 20mM de nickel (NiCl₂) ont été ajoutés ; une structure avec un seul type de site métallique (forme 2) a été obtenue.

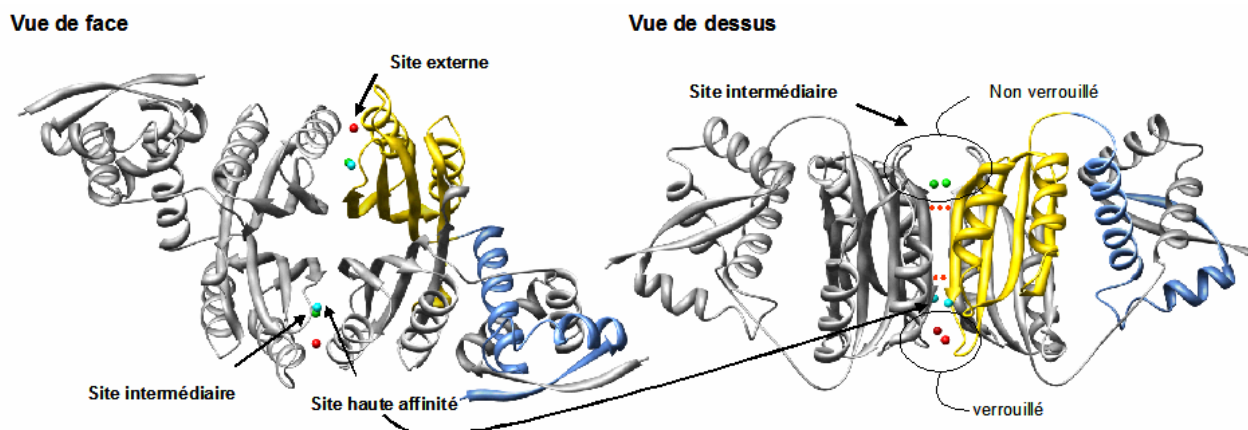


Figure I.37 Structure tridimensionnelle de Holo-HpNikR (résolution : 2.3 Å) (forme 1) en conformation trans-fermée avec une vue de face et de dessus pour mieux noter l'asymétrie des domaines de tétramérisation (Dian *et al.*, 2006). Les cristaux ont été trempés pendant 24H avec du nickel à 100mM à 20°C dans un tampon cryoprotecteur à pH 4.6. En bleu : Domaine de liaison à l'ADN d'une unité monomérique ; En jaune : Domaine C-ter impliqué dans la tétramérisation. Trois sites métalliques sont notables : site de haute affinité (Ni(II) en bleu), site intermédiaire (Ni(II) en vert) et le site externe (Ni(II) en rouge).

I.4.3.2.1. Les sites métalliques de la forme 1

Trois sites métalliques ont été décrits dans la forme 1 de holo-HpNikR (Figure I.38) :

- Le site dit de haute affinité
- Le site intermédiaire
- Le site externe

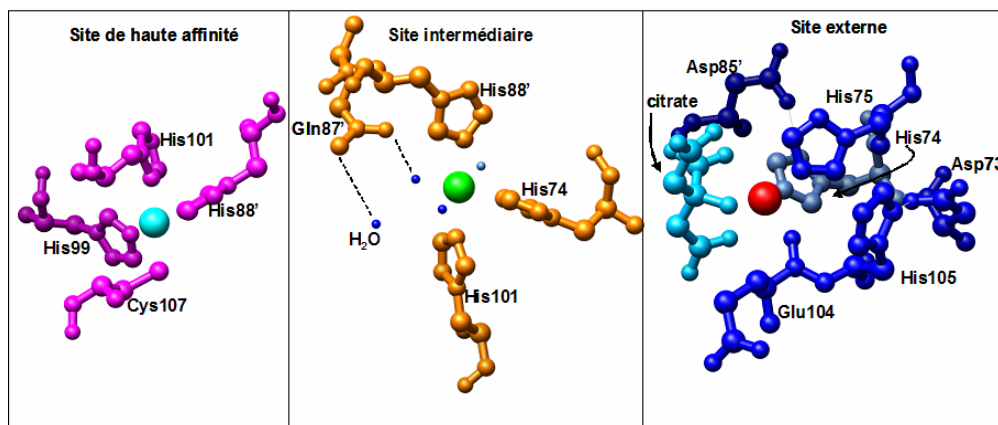


Figure I.38 Les sites métalliques décrits chez HpNikR : le site de haute affinité, le site intermédiaire et le site externe.

Le site dit de haute affinité présente une géométrie plan carré ; le nickel est coordonné par 4 ligands (His 99, 101 et Cys 107 d'une unité monomérique et His 88' d'une unité monomérique adjacente). Seuls deux sites de haute affinité sont métallés par tétramère au lieu des quatre décrits chez Ec et PhNikR. Ils sont localisés du côté « verrouillé » de la protéine. Aucune structure avec les quatre sites de haute affinité n'a encore été obtenue chez HpNikR. Cependant tous les résidus impliqués dans la coordination ou dans le réseau de liaison

hydrogène sont conservés ; une telle conformation doit donc probablement exister mais être peut-être trop contraignante pour l'obtention de cristaux par diffusion du métal.

Le site intermédiaire qui présente une géométrie octaédrique, coordine le nickel avec des ligands du site de haute affinité et du site externe (His 74, 101 d'une unité monomérique, His 88' et Glu 87' *via* une molécule d'eau d'une seconde unité monomérique et deux molécules d'eau pour compléter la sphère de coordination). Seuls deux sites par tétramère sont observés du côté non verrouillé.

Le site externe présente également une géométrie octaédrique. Le nickel est coordiné par 3 ligands de HpNikR (His74, 75 et Glu 104) et par une molécule de citrate. Ce site est stabilisé par un réseau de liaison hydrogène (Asp85-His74 et Asp73-His105-citrate). Il se situe à l'embouchure du site de haute affinité. Ce site est équivalent au site auxiliaire décrit chez PhNikR (His64_{ph}=His74_{Hp} ; Asp65_{ph}=His75_{Hp} et Asp75_{ph}=Asp85_{Hp}), seuls deux sites ont été observés par tétramère par opposition aux quatre décrits chez PhNikR. Les sites externes et les sites de haute affinité peuvent cohabiter.

Le troisième site à Ni(II) décrit chez PhNikR équivalent au site à K⁺ chez EcNikR n'a pas été observé chez HpNikR en dépit du fait que les résidus soient conservés entre les protéines NikR. Ce site ne semble pas nécessaire pour contraindre HpNikR dans une conformation fermée.(Chivers & Tahirov, 2005; Schreiter *et al.*, 2006).

Les sites à nickel décrits dans la forme 2 de holo-HpNikR correspondent à un autre site intermédiaire qualifié de « bis » qui est situé entre le site externe et le site intermédiaire présenté précédemment. Quatre de ces sites par tétramère ont été décrits. Le Ni(II) est coordiné par les résidus H88 d'une unité monomérique et His74' d'une seconde unité. Ces sites présents du côté non verrouillé de la protéine impliqueraient un ion chlorure pour la coordination du Ni(II). La métallation de ces sites implique des changements conformationnels de la protéine (déplacement de l'hélice α 3) du côté verrouillé qui n'auraient pas lieu du côté non-verrouillé de la protéine (Dian *et al.*, 2006). Le site intermédiaire bis du côté verrouillé serait moins stable qu'un site de haute affinité.

L'obtention de ces deux structures a permis de proposer un mécanisme de métallation de la protéine permettant son activation.

I.4.3.2.2. Mécanisme d'activation de HpNikR : Le cheminement du nickel

Un mécanisme d'activation d'HpNikR (Figure I.39) peut être proposé en tenant compte des informations obtenues lors des résolutions de structure (Chivers & Tahirov, 2005; Dian *et al.*, 2006) et des données concernant la capacité de métallation de HpNikR sans ADN (Abraham *et al.*, 2006). La métallation d'HpNikR se fait en plusieurs étapes au cours desquelles elle va subir des réarrangements structuraux.

Le nickel serait transporté d'une « poche » à nickel au site intermédiaire pour ensuite atteindre le site de haute affinité. Une fois les sites de haute affinité saturés, seuls les sites externes sont susceptibles de lier du nickel. L'implication de la métallation de ces sites dans la liaison à l'ADN *in vitro* n'a pas été étudiée et sera entre autre le sujet du chapitre IV de ce travail.

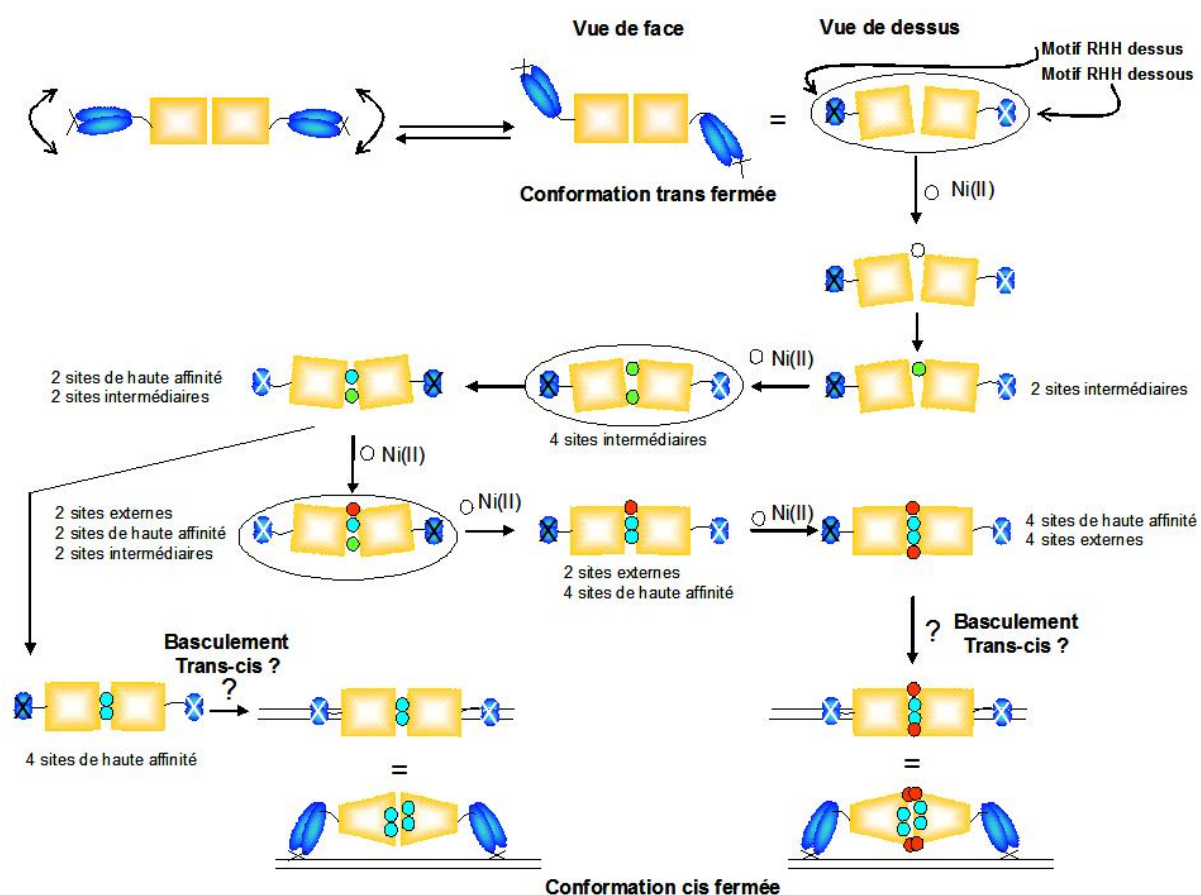


Figure I.39 Cheminement hypothétique du nickel dans HpNikR en vue de son activation (inspiré de (Dian *et al.*, 2006)). Les formes encadrées correspondent aux structures RX résolues.

I.4.4. Mode d'action de la protéine

I.4.4.1. Généralités

Grâce à des études de transcriptomique il a été montré qu'HpNikR était un régulateur global. Il est capable d'induire ou de réprimer l'expression transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du nickel (*nixA*, *hpn*, *ureAB*, *hydABC*, *nikR*), dans le métabolisme du fer (*pfr*, *fur*, *exbB-exbD-tonB*) ou encore dans la mobilité (*flaA*, *flab*) en fonction de la concentration intracellulaire en Ni(II) (Contreras *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2005c).

En considérant les similitudes existant entre HpNikR et EcNikR, il a été proposé que celle-ci lie une séquence palindromique proche de celle de EcNikR (GTATGA -X16- TCATAC) pour réprimer la transcription de gènes.

Une telle séquence a été identifiée en amont du gène codant pour *hpnikR* : GCATGA -16X- TCATGC (Chivers & Sauer, 2000). Des mesures, en utilisant les techniques du gel retard et des gènes rapporteurs, ont permis de mettre en évidence qu'HpNikR se liait sur une séquence contenant ce motif. L'altération du motif palindromique perturbait la liaison d'HpNikR (Contreras *et al.*, 2003). Une étude *in silico* a montré que ce motif n'était pas présent dans le reste du génome de *H. pylori* et plus précisément dans les régions en amont des gènes réprimés. Une absence de liaison par gel retard sur ces séquences (*pfr*, *fur*) a également été constatée. Il a été proposé que les autres gènes réprimés par HpNikR le soient *via* un mécanisme indirect (Contreras *et al.*, 2003).

Ces deux dernières années, différents travaux ont mis en évidence la liaison d'HpNikR sur différentes séquences opératrices en présence de métal (nickel, cuivre, manganèse) : (*ureAB*, *nixA*, *fur*, *nikR*, *exbB*, *fecA3*, et *frpB4*) (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007; Contreras *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2006; Dosanjh *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2005c; Ernst *et al.*, 2006).

Un motif consensus reconnu par HpNikR qui diffère significativement du motif prédit lors de l'étude de Contreras *et al.* en 2003, a été proposé:

TATWATT -N₁₁- AATWATA

Le détail de la liaison d'HpNikR sur 4 de ces séquences opératrices va être décrit avant de présenter un mécanisme d'activation général d'HpNikR. Une étude portant sur la liaison

d'HpNikR sur ces séquences sera présentée dans le chapitre IV, certaines données de la littérature présentées par la suite ont été publiées en parallèle de travaux que je réalisais.

I.4.4.2. Liaison d'HpNikR sur la séquence opératrice de *pureA*

Les gènes codant pour l'uréase, enzyme à nickel essentielle chez *H. pylori*, voient leur expression transcriptionnelle induite entre autre en présence de nickel par HpNikR (Contreras *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2002). Un motif de 19 pb (-70 à -52 par rapport au TSP) situé en amont de promoteur *pureA* avait été proposé comme étant le motif lié par HpNikR (Shirai *et al.*, 1999; van Vliet *et al.*, 2002). Le promoteur *pureA* contrôle l'expression des gènes *ureA* et *ureB* codant pour les sous-unités de l'enzyme. La construction d'un gène rapporteur *ureA::lacZ* au niveau chromosomique chez *H. pylori* (souche 1061) avait permis de tester le rôle de cette séquence dans l'expression inductible de l'uréase par le Ni(II) (van Vliet *et al.*, 2002).

Des mesures d'empreintes à la DNase I ont montré qu'HpNikR sauvage (WT) ne protégeait pas ce motif mais plutôt la région -87 à -54, soit 34 pb (Abraham *et al.*, 2006) (Figure I.40). Ce résultat a confirmé les données observées lors d'études faites avec une protéine taggée en N-ter (Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005c).

```

-145 TAAATTCCTAA AGGGGTATTA AACGCACTTC TAATAACGAT TTTATAGCGC TTCAAAGATA -86
-85  TAACACTAAT TCATTTTAAA TAATAATTAG TTAATGAACG CTTCTGTAA TCTTAGTAAA -26
-25  TCAAAACATT GCTACAATTA CATCCAACCT TGATTTCGTT ATGTCTTCAA GGAAAAACAC +35
+36  TTTAAGAATA GGAGAATAAG ATG
    
```

Figure I.40 Séquence en amont du gène *ureA* chez *Helicobacter pylori* 26695. La numérotation est fonction du +1 de transcription (souligné), la région protégée par HpNikR définie par empreinte à la DNase I est en gras (Abraham *et al.*, 2006), le motif de 19 pb initialement proposé est souligné en pointillé (Shirai *et al.*, 1999; van Vliet *et al.*, 2002).

La liaison d'HpNikR sur cette région a été étudiée par trois techniques différentes, l'empreinte à la DNase I, l'EMSA et l'anisotropie de fluorescence (en parallèle de notre travail, cf. Chapitre IV). Comme pour EcNikR, la liaison du nickel dans le site de haute affinité de HpNikR, mesurée par empreinte à la DNase I, permet la liaison de la protéine à l'ADN avec une affinité moyenne ($K_d \sim 50$ nM) (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007).

En EMSA, un excès de nickel est nécessaire pour observer un complexe ADN-Protéine. L'affinité de la protéine pour l'ADN dans ces conditions n'augmente que très légèrement ($K_d \sim 3-20$ nM) contrairement à EcNikR et la région protégée en empreinte à la DNaseI est inchangée (Abraham *et al.*, 2006).

En anisotropie de fluorescence, l'excès de nickel ne semble pas suffire pour permettre la liaison à l'ADN d'HpNikR, au contraire il induit sa précipitation (Dosanjh *et al.*, 2007). Aucune variation d'anisotropie n'est observée. La liaison à l'ADN (se traduisant par une variation d'anisotropie) n'est observée qu'en présence d'autres cations à forte concentration ($> 250 \mu\text{M}$ et de façon optimale à 3mM) : le magnésium, le calcium et le manganèse ($K_d \sim 20\text{-}50 \text{ nM}$) (Dosanjh *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus en métallant le site de haute affinité par du cuivre au lieu du nickel.

Les résultats observés en empreinte à la DNase I en conditions stoechiométriques et en EMSA, comparés à ceux observés en anisotropie de fluorescence pourraient paraître incohérents. Leur différence a été expliquée en partie par la présence de magnésium et/ou du calcium dans les tampons utilisés en empreinte à la DNaseI, ou en EMSA.

Ces différentes données ont laissé suggérer qu'HpNikR présentait un second site métallique indispensable pour la liaison à l'ADN. Ce site serait de basse affinité et lierait des cations autres que le nickel. Il a été proposé que ce site implique des ligands de l'extension N-ter de HpNikR (Dosanjh *et al.*, 2007). Dernièrement une étude s'intéressant plus spécifiquement à cette extension a permis de mettre en évidence que ce domaine est requis pour une liaison spécifique à l'ADN bien qu'il n'interagisse pas directement avec celui-ci (Benanti & Chivers, 2007). Toutes ces données seront rediscutées et comparées aux nôtres dans le chapitre IV.

I.4.4.3. Liaison d'HpNikR sur la séquence opératrice de *pnixA*

Le gène codant pour NixA, transporteur de la famille des perméases de type HoxN impliqué dans l'importation du nickel, voit son expression transcriptionnelle réprimée par HpNikR en présence de nickel (Ernst *et al.*, 2005c; Wolfram *et al.*, 2006).

Une étude a montré par des empreintes à la DNase I que HpNikR protège une région qui chevauche le promoteur *pnixA*. Cette région fait 36 pb (-14 à +22 selon le TSP) (Ernst *et al.*, 2005c).

-14 AAATATATTACAATTACCAAAAAAGTATTATTTTC +22

Figure I.41 Séquence protégée par HpNikR-Ni en amont du gène *nixA* chez *Helicobacter pylori* 26695. La numérotation est fonction du +1 de transcription (souligné), la région grisée correspond au motif -10 du promoteur de *pnixA* (Ernst *et al.*, 2005c).

Très récemment l'affinité d'HpNikR pour *pnixA* a été déterminée par EMSA en excès de nickel ou en empreinte à la DNaseI (conditions stoechiométriques 1 Ni(II) par monomère) (Benanti & Chivers, 2007). Comme pour la liaison d'HpNikR sur *pureA*, l'affinité de la protéine pour l'ADN est moyenne : $K_{d_{\text{nixA}}} \sim 3.8\text{nM}$ (en EMSA – excès de Ni(II)) - 49nM

(empreinte à la DNaseI – stoechiométrie de Ni(II)). Cette liaison est également dépendante de cations autres que le nickel. Le cation impliqué semble être le magnésium d'après les auteurs. Il a également été mis en évidence que l'extension N-ter jouait un rôle particulier dans la liaison de NikR à *pnixA* par rapport à *pureA*. En effet, en absence de cation, HpNikR ne peut se lier à *pnixA*, par contre elle peut s'y lier si l'extension est tronquée. HpNikR tronquée ne peut pas lier *pureA* en absence de cation (il en est de même sur *pnikR* et sur *pfur*). Le nickel du site de haute affinité pourrait donc suffire à activer la protéine selon la séquence nucléotidique considérée. Les résidus Asp7 et 8 de cette extension N-ter sont responsables de la liaison des cations permettant la liaison de NikR à *pnixA*. Leurs mutations en alanines confèrent à la protéine la même propriété de liaison à *pnixA* que la forme délétée de l'extension N-ter. Le cation lié pourrait éventuellement empêcher des répulsions entre les résidus Asp chargés négativement et l'ADN. Les mutations de ces deux résidus en alanine n'ont pas le même effet sur la capacité de liaison de NikR sur *pnixA* et sur *pureA*. L'extension N-ter ne doit pas présenter la même conformation selon la séquence liée par HpNikR. Un mécanisme différent de liaison des cations doit être mis en place pour la liaison d'HpNikR à *pureA*. Les mécanismes mis en place doivent être fonction des conditions dans lesquelles ces différents gènes sont régulés.

I.4.4.4. Liaison d'HpNikR dans la région intergénique : *nikR-exbB*

HpNikR réprime l'expression transcriptionnelle du gène *nikR* ainsi que des gènes de l'opéron *exbB-exbD-tonB* en fonction du nickel (Contreras *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2006). Ces gènes présentent une organisation particulière puisqu'il s'agit d'un système d'opérons divergents (Figure I.42).

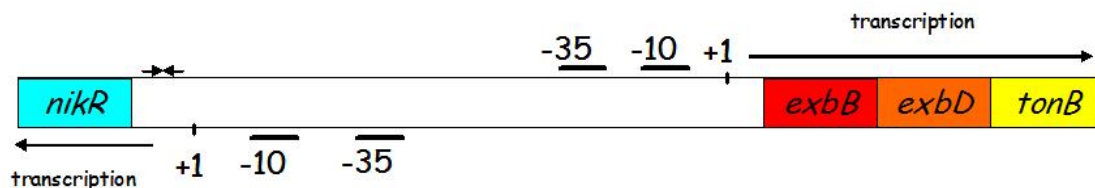


Figure I.42 Organisation de la région intergénique *nikR-exbB*. Les motifs -10 et -35 des promoteurs sont précisés ainsi que le TSP et le sens de transcription. La séquence palindromique prédite devant le gène *nikR* pour la liaison d'HpNikR est représentée par deux flèches opposées.

En 2003, il a été montré par EMSA ainsi que par gènes rapporteurs qu'HpNikR liait une séquence palindromique dans la région promotrice de son gène pour s'autoréguler (Contreras *et al.*, 2003). Cependant ce résultat a été remis en cause en 2005. Il a été montré par des empreintes à la DNaseI que HpNikR ne liait pas ce motif mais plutôt une région (-27 à +10 par rapport au TSP) chevauchant le promoteur *pnikR* (Delany *et al.*, 2005). Il s'avère que la

séquence testée en EMSA lors de l'étude faite par Contreras *et al.* en 2003 comprenait le motif de liaison identifié par Delany *et al.*

Il a également été montré qu'HpNikR lie une région (-37 à +1 par rapport au TSP) chevauchant le promoteur *pexbB* (Figure I.43). La protéine utilisée dans cette étude présente 3 acides-aminés supplémentaires en N-ter (GSH). La présence de ces résidus ne semble pas influencer la liaison à l'ADN (liaison sur *pureA* similaire à la protéine sauvage) bien qu'il y ait un ligand potentiel du Ni(II).

HpNikR lie ces deux séquences en présence d'un excès de métal (100µM de nickel ou de manganèse pour 0,13 ; 0,4 ; 1,2 et 4µM de protéine (monomère)). Aucune influence du magnésium, ni de l'extension N-ter sur la liaison d'HpNikR sur ces deux séquences n'a encore été décrite.

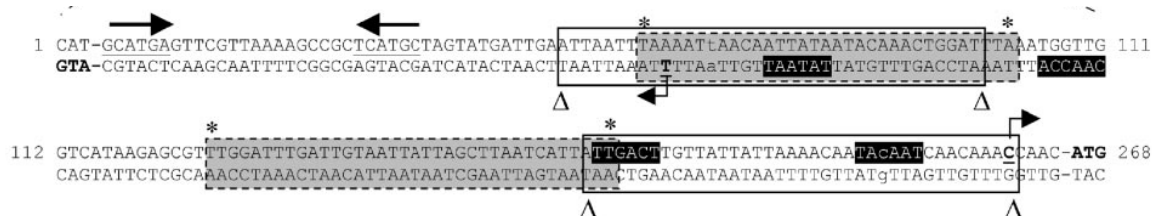


Figure I.43 Région intergénique *nikR-exbB*. Les motifs -10 et -35 des promoteurs sont surlignés en noir. Le TSP est indiqué par une flèche courbée. Le motif prédit pour la liaison de HpNikR pour réprimer sa transcription est indiqué par les flèches en sens opposé. Les régions protégées par HpNikR sont dans les cadres ouverts. Les régions protégées par HpFUR sont dans les cadres grisés. (Delany *et al.*, 2005)

Lors de cette même étude, il a également été montré que HpFUR, le métallorégulateur impliqué dans le métabolisme du fer chez *H. pylori*, pouvait non seulement lier une séquence opératrice chevauchant *pnikR* mais aussi une séquence opératrice qui chevauche très partiellement *pexbB* en présence de nickel et de manganèse. Ces données ont mis en évidence une éventuelle régulation croisée entre les deux principaux métallorégulateurs d'*H.pylori* en fonction de la disponibilité en ion métallique. Cette régulation nous a particulièrement intéressés et nous a conduits à étudier la liaison d'HpFUR sur cette région, cet aspect sera décrit dans le chapitre V.

I.4.4.5. Mécanisme d'action général d'HpNikR

Un mécanisme d'action d'HpNikR peut être proposé (Figure I.44) au regard des données concernant les caractérisations structurales d'HpNikR ainsi que l'activation de la protéine par le métal en présence d'ADN.

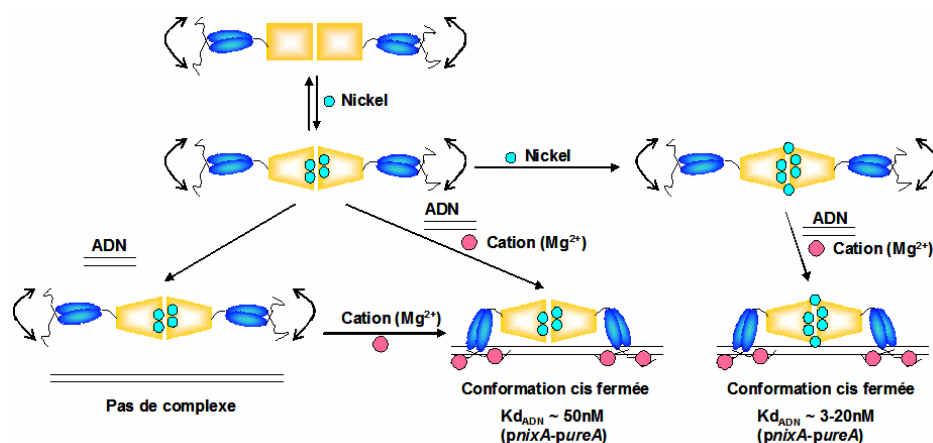


Figure I.44 Mécanisme d'action hypothétique d'HpNikR pour la liaison sur *pureA* et *pnxA* (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007).

HpNikR présente à l'état de tétramère ne peut lier l'ADN en absence de métal. La liaison du nickel dans son site de haute affinité induit des changements conformationnels au sein du domaine de tétramérisation. La liaison du nickel dans ce site unique ne semble pas suffire pour rendre active la protéine (liaison sur *pnxA*, *pureA*). Elle requiert l'addition de cations tels que le magnésium. Le site qui coordine ce cation n'est pas situé entre le domaine Nter et le domaine Cter comme le second site à nickel chez PhNikR ou à K^+ chez EcNikR. Des mutations des résidus conservés Glu39 (équivalent à E30_{Ec} et E32_{Ph}) et Asp43 (équivalent à D34_{Ec} et D36_{Ph}) en alanines ne perturbent pas la liaison d'HpNikR à l'ADN (Benanti & Chivers, 2007). Ce nouveau site serait localisé au niveau de l'extension N-ter. Cette dernière, d'ailleurs, influencerait la liaison spécifique d'HpNikR sur les séquences opératrices et contribuerait à des contraintes imposées à la protéine pour se lier à l'ADN (séquence dépendante).

Pour lier l'ADN, HpNikR est plus contrainte structuralement que EcNikR. L'espacement entre les deux motifs liés est de 11pb par rapport aux 16pb pour le motif de EcNikR. Cette contrainte permettrait d'expliquer l'absence de nécessité de lier du nickel ou du K^+ dans un second site chez HpNikR. Les sites intermédiaires et externes chez HpNikR ne seraient que des sites « d'acheminement » du métal au site spectroscopique (Dian *et al.*, 2006).

Tout cela sera rediscuté dans la discussion du chapitre IV après présentation de nos résultats.

I.4.5. NikR et le nickel chez *H. pylori*

Le nickel joue un rôle essentiel dans la colonisation et la persistance d'*Helicobacter pylori* dans sa niche écologique, le mucus gastrique chez l'Homme. Cette importance vient du fait que ce métal est le cofacteur de deux enzymes essentielles : l'uréase et l'hydrogénase à NiFe.

L'uréase qui représente près de 10% des protéines totales chez *H. pylori*, est essentielle pour la colonisation et la virulence bactérienne. Elle assure l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en acide carbonique. Elle permet à la bactérie de tamponner son pH cytoplasmique et périplasmique. L'hydrogénase, quant à elle, assure l'oxydation de l'hydrogène moléculaire. Ce processus génère des électrons à bas potentiel qui permettent par la suite la réduction de différents substrats et la production d'énergie (Maier *et al.*, 1996; Olson & Maier, 2002).

Ces enzymes nativement sont inactives, elles sont « immatures », leur site actif est dépourvu de métal. La maturation et l'activation de ces deux enzymes sont assurées par des protéines accessoires et chaperonnes : UreIEFGH et HypABCDEF. Les mécanismes de maturation seront présentés par la suite.

La concentration en nickel intracellulaire est finement contrôlée afin de limiter sa toxicité cellulaire. Le contrôle de l'homéostasie a lieu à différents niveaux : Le transport du nickel (import/export) et le stockage. L'utilisation du nickel (métabolisme) est également contrôlée. La majeure partie de ces fonctions (homéostasie et métabolisme) dépend du régulateur HpNikR ([Figure I.45](#)) qui réprime ou active l'expression transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. Ce métallorégulateur, dont l'expression transcriptionnelle est dépendante de l'acidification du pH (induction) (van Vliet *et al.*, 2004), s'autocontrôle négativement en présence de nickel (Contreras *et al.*, 2003).

D'autres systèmes de régulation comme HpFUR et le système à double-composante ArsRS, sont impliqués dans le métabolisme du nickel. HpFUR sous forme apo semble réprimer l'expression de l'opéron *hydABC* codant pour l'hydrogénase NiFe (Ernst *et al.*, 2005a) et l'expression génique d'HpFUR est elle-même réprimée par HpNikR (Contreras *et al.*, 2003; Delany *et al.*, 2005; van Vliet *et al.*, 2004). HpFUR métallée semble également réprimer l'expression transcriptionnelle du système énergétique ExbB-ExbD-TonB ainsi que la protéine de stockage Hpn-like (Ernst *et al.*, 2005a). Le système à double composante ArsRS dont la fonction est acidité-dépendante contrôle l'expression de plus de 100 gènes (Pflock *et al.*, 2006a) parmi lesquels on retrouve les opérons *ureAB* et *ureIEFGH* (Pflock *et al.*, 2005) ainsi que les gènes codant pour ExbB-ExbD-TonB, Hpn, Hpn-like ou encore HypA et HypE (Pflock *et al.*, 2006a; Wen *et al.*, 2006). L'expression de ce régulateur serait également dépendante de FUR (Danielli *et al.*, 2006).

Au travers du contrôle de l'homéostasie du nickel et de son métabolisme, on constate que les trois principaux régulateurs chez *H. pylori*, NikR, FUR et ArsRS sont liés ([Figure I.45](#)). Ils le sont également dans la résistance au stress acide (contrôle de l'expression des gènes codant

pour les amidases AmiE, AmiF et l'uréase) (Pflock *et al.*, 2005; Pflock *et al.*, 2006a; Pflock *et al.*, 2006b).

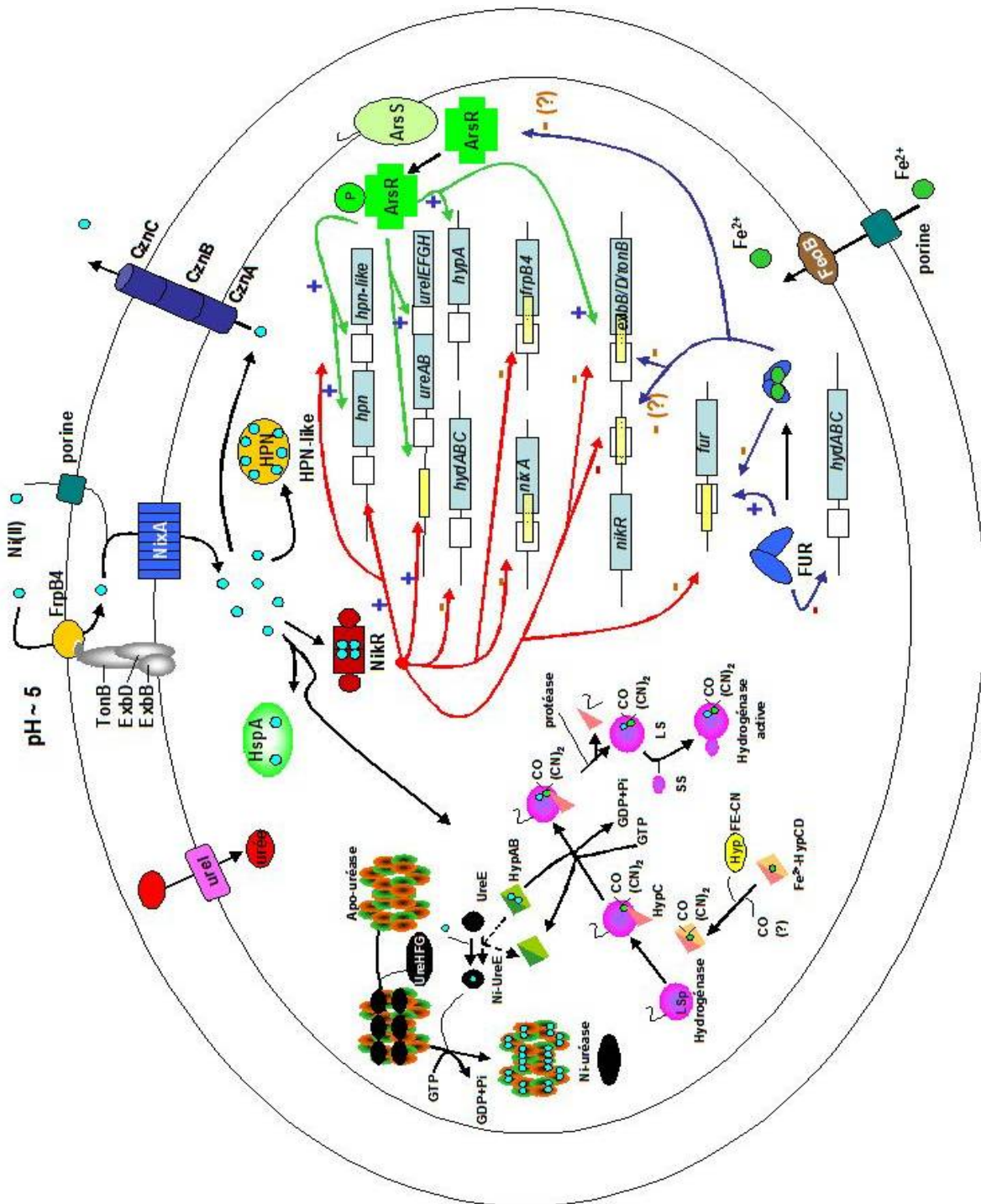


Figure I.45 Le nickel chez *Helicobacter pylori* : le métabolisme et l'homéostasie. Deux protéines essentielles chez ce micro-organisme lient du nickel : l'uréase (UreAB) et l'hydrogénase à NiFe (Hyp). Leurs activations nécessitent avant tout une maturation permise par des protéines accessoires (UreIEFGH, HypABCDEF, HspA). L'expression de ces protéines est sous le contrôle de régulateurs : NikR (↑), FUR (↑), ArsRS (↑). Ces mêmes régulateurs contrôlent également l'homéostasie du nickel en contrôlant l'expression transcriptionnelle des transporteurs (NixA, FrpB4), des systèmes énergétiques (ExbB/D/TonB), et des systèmes de stockages (Hpn, Hpn-like). Les régulations inductrices et répressives sont précisées par le + et - respectivement.

Les différents partenaires impliqués dans l'homéostasie et le métabolisme du nickel vont être présentés à l'exception des régulateurs (HpNikR et HpFUR sont décrits par ailleurs en détail).

I.4.5.1. Les enzymes à nickel

I.4.5.1.1. L'hydrogénase à NiFe

L'hydrogénase est constituée de plusieurs sous-unités : une grande notée LS et une petite notée SS. L'hydrogénase à NiFe possède un site binucléaire à NiFe.

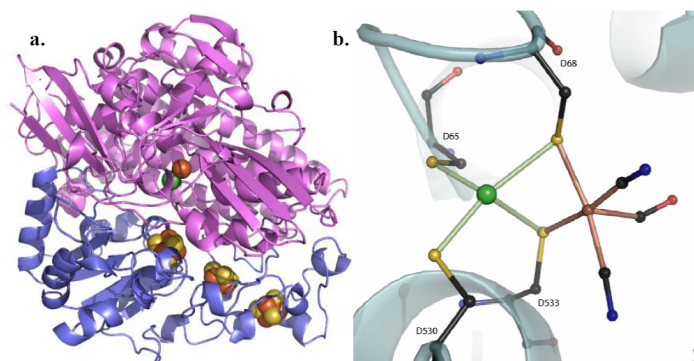


Figure I.46 Structure de l'hydrogénase à NiFe de *D. gigas* (code PDB : 2FRV). A) Structure cristallographique de l'hydrogénase à NiFe de *D. gigas*. La petite sous-unité est représentée en bleu. La grande sous-unité est représentée en violet. A l'interface des deux sont représentés les clusters [4Fe4S] et [3Fe4S]. Le nickel et le fer sont respectivement représentés par des sphères vertes et rouges. B) Site actif de l'hydrogénase à NiFe de *D. gigas*. (Représentation tirée de (Cherrier, 2005)).

- La maturation

Les sous-unités nouvellement synthétisées ne peuvent former une enzyme active. Un processus de maturation est nécessaire, au cours duquel la sous-unité LS néosynthétisée (notée LSp) va acquérir ses cofacteurs métalliques dans son site actif ainsi qu'être protéolysée avant de pouvoir interagir avec la sous-unité SS.

La maturation de l'enzyme est permise par des protéines accessoires HypABCDEF.

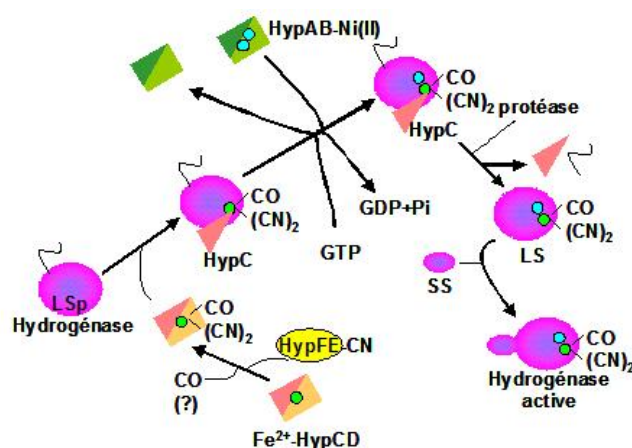


Figure I.47 Mécanisme théorique de la maturation de l'hydrogénase à NiFe chez *H. pylori* en 4 étapes.

Les étapes de maturation de l'hydrogénase à NiFe de *H.pylori* doivent *a priori* être proches de celles décrites pour des hydrogénases à NiFe d'autres micro-organismes (Figure I.47) (Bock *et al.*, 2006; Leach & Zamble, 2007; Maier *et al.*, 2007).

La première étape consisterait en l'incorporation du fer avec ses ligands non protéiques par la LSp. Cette étape requiert les protéines accessoires HypCDEF. Les protéines chaperonnes HypC et HypD forment avec le fer un complexe qui est reconnu par le dimère composé des protéines HypE et HypF. Sous l'action de ces deux protéines et d'une hydrolyse d'ATP, le fer va acquérir ses 3 ligands non protéiques (un CO et deux CN), constitutifs du site actif. La fixation de HypC à la LSp est supposée provoquer un changement de conformation de cette dernière, ce qui permet la liaison du fer et de ses 3 ligands.

La seconde étape consisterait en l'incorporation du nickel par le complexe CO-(CN)₂-Fe-LSp-HypC couplée à une hydrolyse de GTP. Cette étape requiert un complexe protéique fait de HypA et de HypB.

La troisième étape consisterait en la dissociation du complexe CO-(CN)₂-Fe-Ni-LSp de HypC ainsi que du clivage de l'extension Cter. Il en résulterait une sous-unité LS mature possédant son site actif.

La quatrième étape consisterait en l'association de la sous-unité LS mature avec la sous-unité SS permettant la formation d'une hydrogénase activée.

- Régulation de la synthèse protéique de l'hydrogénase et des protéines de maturation

L'expression des gènes codant pour l'hydrogénase (*hydABCD*) ou pour des protéines accessoires (HypA) est contrôlée au niveau transcriptionnel. HpNikR métallée et HpFUR apo répriment la transcription des gènes de l'hydrogénase (Contreras *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2005a).

Certains gènes de protéines accessoires comme *hypA* ont leur expression contrôlée par ArsRS en fonction du pH (Wen *et al.*, 2006). L'expression de *hypB* serait également régulée en fonction du pH, mais serait ArsRS-indépendante.

I.4.5.1.2. L'uréase

L'uréase est une enzyme essentielle pour la colonisation et la virulence bactérienne. C'est une macromolécule faite de quatre trimères d'hétérodimères (Ha *et al.*, 2001). L'unité de base est constituée d'un monomère UreA et d'un monomère UreB. Cette unité de base présente un site binucléaire à nickel. L'uréase a donc 12 sites binucléaires, soit 24 nickels par enzyme active.

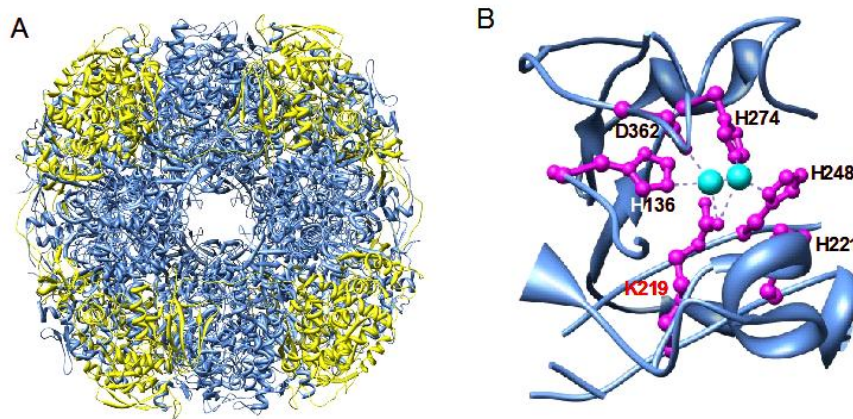


Figure I.48 Structure de l'uréase d'*Helicobacter pylori* (résolution : 3Å) (code PDB : 1e9Z). A) Structure cristallographique de l'uréase, c'est une macromolécule faite de quatre trimères d'hétérodimères. Les sous-unités A et B sont représentées en jaune et en bleu respectivement. B) Site actif de l'uréase : site binucléaire à Ni(II) où la lysine K219 coordonne les deux Ni(II) (Ha *et al.*, 2001).

- La maturation

L'enzyme néo-synthétisée n'est active qu'après un processus de maturation au cours duquel, l'uréase va acquérir son cofacteur métallique (Figure I.49). Cette maturation fait intervenir 4 protéines accessoires UreEFGH (Maier *et al.*, 2007).

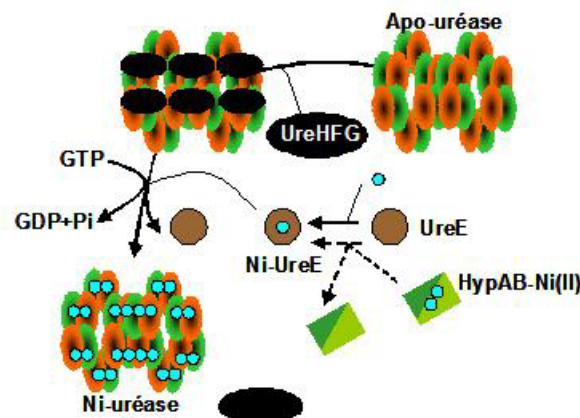


Figure I.49 Maturation de l'uréase chez *H. pylori*.

UreE, dimère liant 1 nickel, servirait de transporteur du nickel du cytoplasme à l'enzyme. UreG serait, quant à elle, impliquée dans la maturation de l'uréase en raison de son activité GTPasique. L'hydrolyse du GTP serait requise pour le transfert du nickel et/ou les interactions/dissociations des protéines. Les fonctions des protéines UreF et H ne sont pas clairement identifiées. Ce seraient des protéines chaperonnes par analogie aux descriptions faites pour UreD (équivalent à UreH chez *H. pylori*) et F chez d'autres micro-organismes. UreH formerait un premier complexe avec l'uréase-apo induisant des changements conformationnels de cette dernière. Après quoi UreF s'associerait à UreH-uréase, puis UreG.

UreE s'associerait alors à UreGFH-Uréase avant de transférer son nickel. Les protéines accessoires se dissocieraient de l'enzyme métallée qui serait alors active (Maier *et al.*, 2007). Certaines protéines accessoires indispensables à la maturation de l'hydrogénase, HypA et HypB, interviennent également dans la maturation de l'uréase avec un apport de Ni(II) à UreE (Benoit *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2001). Il n'en est pas de même pour les protéines impliquées dans la maturation de l'uréase comme UreE et UreG.

Dernièrement une interaction entre HypA et UreE a été décrite par des expériences de cross-link (Benoit *et al.*, 2007), il semblerait qu'elle ait lieu en présence de faible concentration en nickel. HypA faciliterait l'apport de nickel pour l'activation de l'uréase en raison de sa meilleure capacité à lier du nickel que UreE.

La maturation de l'uréase semble également dépendante d'une protéine de choc thermique appartenant à la famille GroES, HspA (Kansau *et al.*, 1996). Elle jouerait plutôt un rôle de chaperonne. Cette dernière présente deux domaines, un domaine N-ter qui est similaire aux protéines de type GroES et une extrémité C-ter riche en histidines. HspA est capable de lier 2 nickels par protéine avec un Kd de 1,8 μ M.

- L'activité de l'uréase

L'uréase métallée est donc active, cette dernière assure l'hydrolyse de l'urée en deux molécules d'ammoniac et en acide carbonique. Ce dernier est converti en dioxyde de carbone sous l'action de l'anhydrase carbonique β cytoplasmique (β -CA). L'ammoniac et le dioxyde de carbone diffusent dans le périplasme. Le CO₂ est alors converti en bicarbonate par l'anhydrase carbonique α périplasmique (α -CA). En raison de son pouvoir tampon élevé (pKa 6,1), le bicarbonate va « tamponner » ce milieu (pKa : 6,1) (Sachs *et al.*, 2005). L'ammoniac, lui, va piéger les protons pour former de l'ammonium ([Figure I.50](#)).

Le substrat de l'enzyme, l'urée, est transporté du périplasme au cytoplasme *via* le canal proton-dépendant UreI. Le gène codant pour UreI est co-transcrit avec les gènes codant pour les protéines de maturation de l'uréase.

- Régulation de la synthèse protéique de l'uréase et des protéines accessoires

Cette synthèse est régulée à deux niveaux (Pflock *et al.*, 2006b) :

- au niveau transcriptionnel par NikR en fonction du Ni(II) et par ArsRS en fonction du pH
- au niveau post-transcriptionnel par le « pH » (Akada *et al.*, 2000)

- 107 -

I.4.5.2. Les transporteurs de nickel

I.4.5.2.1. L'importation du nickel

Le transport du nickel à travers la membrane externe est effectué principalement par NixA, qui appartient à la famille des transporteurs NiCoT. C'est une protéine membranaire (8 segments transmembranaires) qui présente une haute affinité pour le nickel (K_d : 11.3 nM) (Fulkerson & Mobley, 2000; Mobley *et al.*, 1995). L'expression transcriptionnelle de son gène est réprimée par HpNikR de façon nickel-dépendante (Ernst *et al.*, 2005c; Wolfram *et al.*, 2006).

Jusqu'en 2007, il était considéré que le passage du nickel du milieu extérieur au périplasme se faisait par diffusion au travers de porines. Dernièrement, un récepteur de la membrane externe FrpB4 couplé à la machinerie énergétique ExbB/ExbD/TonB a été décrit comme permettant le transport du nickel à travers la membrane externe à pH acide (Schauer *et al.*, 2007).

Ce genre de récepteur (FrpB1 / FecA1 /FecA2) couplé à cette machinerie n'avait jusqu'alors été décrit que pour le transport du fer et était contrôlé par FUR (Ernst *et al.*, 2005a).

Il vient d'être décrit que l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour FrpB4 et pour la machinerie ExbB/ExbD/TonB était réprimée par HpNikR de façon Ni-dépendante (Contreras *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2006; Schauer *et al.*, 2007). Il en serait de même pour le récepteur membranaire FecA3, qui ne serait régulé que par NikR de façon Ni-dépendante (Ernst *et al.*, 2006). Le contrôle de l'expression transcriptionnelle de la machinerie ExbB/ExbD/TonB (gènes 1339 à 1341) par HpFUR (Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005a) est sujette à discussion (Ernst *et al.*, 2006). Cette machinerie n'est pas unique chez *H. pylori* qui présente deux autres gènes *exbB-exbD* et un autre gène *tonB*.

I.4.5.2.2. L'exportation du nickel

Un système de pompe à efflux CznABC a récemment été décrit (Stahler *et al.*, 2006). Il assure l'exportation du Cadmium, du Zinc et du Nickel. Des mutants de ce système ont uniquement montré une sensibilité accrue face au stress Cd(II), Zn(II) ou Ni(II). Il n'en est pas de même face au Fe(II), Co(II), Cu(II) et Bi(III).

Il a été proposé que ce système *in vivo* module l'activité de l'uréase :

Par réduction de son activité *via* l'exportation du nickel

Par protection d'une inhibition fonctionnelle *via* l'exportation du cadmium et du zinc

Aucun contrôle de l'expression transcriptionnelle des gènes de ce système n'a jusqu'à présent été décrit.

I.4.5.3. *Les protéines de stockage et de détoxification*

Deux protéines riches en histidines, Hpn et Hpn-like, sont impliquées dans le stockage ainsi que dans la détoxification du nickel (ainsi que du cobalt et du cadmium) en fonction de sa disponibilité cellulaire (Seshadri *et al.*, 2007). A des concentrations modérées en Ni(II), ces deux protéines peuvent lier du nickel afin de limiter l'activité de l'uréase si cette dernière n'est pas requise. L'expression protéique n'est par ailleurs pas modifiée. Une compétition entre Hpn/Hpn-like et les protéines de maturation de l'uréase semble être mise en jeu. L'activité de l'hydrogénase, quant à elle, ne semble pas affectée par la fonction de ces protéines.

A haute concentration en nickel, Hpn et Hpn-like protège la cellule de la toxicité métallique. Ce mécanisme assure une réponse rapide de la cellule pour faire face au nickel avant que les changements concernant l'expression des transporteurs ne soient efficaces.

Hpn, pour *H. pylori* nickel, qui représente près de 2% des protéines totales chez *H. pylori*, est une petite protéine cytoplasmique de 60 résidus amino-acides dont 28 sont des histidines (Gilbert *et al.*, 1995). Hpn qui forme des oligomères (20 unités), peut lier jusqu'à 5 nickels par unité monomérique avec un Kd de 7,1µM. Cette liaison est réversible en présence de chélateur ou en conditions acides (Ge *et al.*, 2006a). *In vitro* Hpn peut lier de nombreux métaux parmi lesquels le nickel, le cuivre, le zinc, le bismuth..., cependant *in vivo* elle semble plus sélective du nickel (Ge *et al.*, 2006b).

Hpn-like, est également une protéine cytoplasmique de 72 résidus amino-acides dont 25% et 42% sont des histidines et des glutamines respectivement. Sa séquence en N-ter présente 56% d'identité avec Hpn, c'est pour cette raison qu'elle a été nommée Hpn-like (Maier *et al.*, 2007; Seshadri *et al.*, 2007).

L'expression transcriptionnelle des gènes codant pour ces deux protéines est activée par NikR de façon Ni-dépendante (Contreras *et al.*, 2003) et par le système à double composante ArsRS en condition acide (pH5) (Pflock *et al.*, 2006a).

Les différents partenaires impliqués dans le métabolisme et l'homéostasie du Ni(II) qui viennent d'être présentés, sont schématiquement représentés dans la [Figure I.45](#). Elle traduit un certain niveau de complexité cellulaire où les régulations menées par HpNikR, HpFUR et ArsRS s'entrecroisent.

I.5. Les autres métallorégulateurs du Ni(II)

Il existe au moins trois autres classes de protéines métallorégulatrices capables de répondre face à un stress Ni(II) en contrôlant l'expression transcriptionnelle de gènes. Il s'agit de NmtR, de SrnRQ et de Nur.

NmtR et Nur appartiennent respectivement aux familles de métallorégulateurs SmtB/ArsR et Fur qui ont été présentées en détail en première partie. SrnRQ, quant à elle, est un complexe octa-hétérodimérique, où SrnR joue le rôle de répresseur et présente un motif de liaison à l'ADN similaire au membre de la sous-famille Ars. SrnQ joue le rôle de co-répresseur qui lie le Ni(II). En dépit du fait que SrnR présente une homologie de séquence avec des membres de la sous-famille Ars, le mode d'action diffère fortement.

NmtR, de *Mycobacterium tuberculosis*, réprime l'expression transcriptionnelle du gène *nmtA* qui code pour une ATPase de P1 (Cavet *et al.*, 2002) en absence de Ni(II) et de Co(II). Sous stress Ni(II)/Co(II), la transcription est déréprimée, le système d'efflux NmtA est exprimé et ces deux métaux sont alors expulsés de la bactérie.

Nur, de *Streptomyces coelicolor*, réprime directement, après activation par du Ni(II), l'expression transcriptionnelle des gènes *sodF*, *nikABCDE* codant respectivement pour la superoxyde dismutase à Fe(II) et pour un transporteur putatif à Ni(II) de type ABC (Ahn *et al.*, 2006). Elle activerait également l'expression transcriptionnelle du gène *sodN* codant pour la SOD à Ni(II). Cependant Nur ne se lie pas en amont du gène, un mécanisme de régulation indirecte est fortement envisageable.

SrnRQ, de *Streptomyces griseus*, réprime de façon originale l'expression transcriptionnelle de la SOD à FeZn en présence de Ni(II) (Kim *et al.*, 2003). SrnRQ, forme un complexe protéique, en absence de Ni(II). Ce complexe dans cette condition ne se lie pas à l'ADN. En présence de Ni(II), des changements conformationnels sont opérés au niveau de SrnQ, permettant alors au complexe SrnRQ-Ni de se lier à l'ADN *via* SrnR. Bien que SrnRQ et Nur présente une homologie fonctionnelle, il n'en est pas de même au niveau de la séquence.

I.6. Présentation du travail

Au début de ce travail, l'objectif premier était de comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de la sélectivité ionique de protéines métallorégulatrices comme NikR d'*Escherichia coli* vis-à-vis des métaux. En effet, cette dernière est activable *in vitro* par différents métaux bien qu'*in vivo* elle ne soit impliquée que dans l'homéostasie du nickel. La sélectivité ionique peut avoir des origines diverses : la nature du site de liaison (la géométrie du site, le nombre et la nature des ligands), l'affinité pour le métal, la disponibilité en métal dans la bactérie, la présence de métallochaperonne ou encore la cinétique de liaison du métal. Des caractérisations spectroscopiques et cinétiques de la métallation d'EcNikR et d'un mutant, EcNikR Q2E, ont dans un premier temps été initiées. Une partie de mon travail, présentée dans le chapitre II, a consisté à montrer que EcNikR sauvage et son mutant ont des propriétés de métallation similaires. Ceci afin de valider les études antérieures, réalisées par un stagiaire post-doctoral (Rutger Diederix), portant sur l'affinité d'EcNikR Q2E pour le nickel. Ce travail a permis de remettre en cause les constantes de dissociation de l'ordre du picomolaire décrites dans la littérature pour le complexe EcNikR-Ni(II). Nos données conduisent à une constante de dissociation de l'ordre de la centaine de nanomolaires.

Ce travail a toutefois été restreint en raison d'une propriété d'EcNikR qui est peu décrite dans la littérature. Elle précipite en présence de plus de 1 équivalent de nickel ajouté par sous unité monomérique. Ce comportement perturbe sa liaison à l'ADN et donc son évaluation.

Des travaux ont été initiés afin de comprendre cette agrégation, de s'en soustraire pour faciliter l'étude de la protéine *in vitro*. L'ensemble des travaux menés sur EcNikR ont conduit à l'écriture de deux publications, l'une étant parue dans Biochimie et la seconde étant soumise à JBIC. Elles sont présentées dans le chapitre II.

Les difficultés de travail rencontrées chez EcNikR, nous ont amenés à travailler sur une protéine voisine, NikR d'*Helicobacter pylori* à partir de fin 2005. Cette dernière est impliquée dans la régulation de l'expression transcriptionnelle d'une enzyme de virulence, l'uréase, qui est essentielle au développement d'*Helicobacter pylori* dans l'estomac de l'être humain. Ce microorganisme est amené à faire face à des stress acides en raison de sa niche écologique. Le pH cytoplasmique s'en trouve parfois diminué (acidification), bien qu'il soit rapidement tamponné par l'action entre autre de l'uréase qui est non seulement Ni(II)-NikR-dépendante mais aussi pH-dépendante ; nous nous sommes donc intéressés aux effets du Ni(II) et du pH sur cette protéine. Ce travail a également été décrit dans la publication parue dans Biochimie et est présenté aussi dans le chapitre III.

Deux projets ont été développés autour d'HpNikR. Le premier traite des propriétés de liaison métallique d'HpNikR, les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre III. Le second s'intéresse à la liaison d'HpNikR à l'ADN (régions promotrices de gènes induits ou réprimés) et les résultats sont présentés dans le chapitre IV. Pour cette étude, trois techniques ont été utilisées : la mesure de retard sur gel, l'anisotropie de fluorescence et un test de protection à la nucléase.

Par ailleurs des travaux publiés en 2005, par Delany *et al.*, ont mis en évidence une potentielle régulation croisée entre les deux principaux métallorégulateurs d'*H.pylori* NikR et FUR en fonction de la disponibilité en ions métalliques (Delany *et al.*, 2005). Afin d'étudier plus spécifiquement cette régulation croisée, des travaux préliminaires de caractérisation de FUR d'*H.pylori* ont été initiés et seront présentés dans le chapitre V.

Enfin une conclusion générale portant sur l'ensemble des résultats sera développée dans le chapitre VI.

I.7. Références

- Abraham, L. O., Li, Y. & Zamble, D. B. (2006). The metal- and DNA-binding activities of *Helicobacter pylori* NikR. *J Inorg Biochem* 100, 1005-1014.
- Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1999). Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 6248-6260.
- Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S. S., Vazquez-Laslop, N. & Neyfakh, A. A. (1995). Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J Bacteriol* 177, 3904-3910.
- Ahn, B. E., Cha, J., Lee, E. J., Han, A. R., Thompson, C. J. & Roe, J. H. (2006). Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 59, 1848-1858.
- Akada, J. K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M. & Nakazawa, T. (2000). Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* 36, 1071-1084.
- Alamuri, P., Mehta, N., Burk, A. & Maier, R. J. (2006). Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S cluster synthesis protein NifS by iron, oxidative stress conditions, and fur. *J Bacteriol* 188, 5325-5330.
- Amabile-Cuevas, C. F. & Demple, B. (1991). Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res* 19, 4479-4484.
- Ansari, A. Z., Bradner, J. E. & O'Halloran, T. V. (1995). DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* 374, 371-375.
- Bagg, A. & Neilands, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471-5477.
- Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184, 5826-5832.
- Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J. D. (2002). Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* 45, 1613-1629.
- Barrineau, P., Gilbert, P., Jackson, W. J., Jones, C. S., Summers, A. O. & Wisdom, S. (1984). The DNA sequence of the mercury resistance operon of the IncFII plasmid NR1. *J Mol Appl Genet* 2, 601-619.
- Benanti, E. L. & Chivers, P. T. (2007). The N-terminal arm of the *Helicobacter pylori* Ni²⁺-dependent transcription factor NikR is required for specific DNA-binding. *J Biol Chem*.
- Benoit, S. L., Mehta, N., Weinberg, M. V., Maier, C. & Maier, R. J. (2007). Interaction between the *Helicobacter pylori* accessory proteins HypA and UreE is needed for urease maturation. *Microbiology* 153, 1474-1482.
- Binet, M. R. & Poole, R. K. (2000). Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 473, 67-70.
- Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Metal-selective DNA-binding response of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10029-10038.
- Bock, A., King, P. W., Blokesch, M. & Posewitz, M. C. (2006). Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol* 51, 1-71.

- Braun, V., Schäffer, S., Hantke, K. & Tröger, W. (1990). Regulation of Gene Expression by Iron. In *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism Colloquium Mosbach 1990*, pp. 165-179. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27, 145-163.
- Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* 2, 57-65.
- Busenlehner, L. S., Apuy, J. L. & Giedroc, D. P. (2002a). Characterization of a metalloregulatory bismuth(III) site in *Staphylococcus aureus* pI258 CadC repressor. *J Biol Inorg Chem* 7, 551-559.
- Busenlehner, L. S., Weng, T. C., Penner-Hahn, J. E. & Giedroc, D. P. (2002b). Elucidation of primary (alpha(3)N) and vestigial (alpha(5)) heavy metal-binding sites in *Staphylococcus aureus* pI258 CadC: evolutionary implications for metal ion selectivity of ArsR/SmtB metal sensor proteins. *J Mol Biol* 319, 685-701.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 27, 131-143.
- Carrington, P. E., Chivers, P. T., Al-Mjeni, F., Sauer, R. T. & Maroney, M. J. (2003). Nickel coordination is regulated by the DNA-bound state of NikR. *Nat Struct Biol* 10, 126-130.
- Cavet, J. S., Meng, W., Pennella, M. A., Appelhoff, R. J., Giedroc, D. P. & Robinson, N. J. (2002). A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J Biol Chem* 277, 38441-38448.
- Cavet, J. S., Graham, A. I., Meng, W. & Robinson, N. J. (2003). A cadmium-lead-sensing ArsR-SmtB repressor with novel sensory sites. Complementary metal discrimination by NmtR AND CmtR in a common cytosol. *J Biol Chem* 278, 44560-44566.
- Champier, L., Duarte, V., Michaud-Soret, I. & Coves, J. (2004). Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon. *Mol Microbiol* 52, 1475-1485.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. & Mondragon, A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301, 1383-1387.
- Checa, S. K., Espariz, M., Audero, M. E., Botta, P. E., Spinelli, S. V. & Soncini, F. C. (2007). Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Mol Microbiol* 63, 1307-1318.
- Cherrier, M. V. (2005). Etude cristallographique des protéines NikA et NikR impliquées dans le transport du nickel chez *Escherichia coli*. Quand la structure de NikA met en évidence l'existence possible d'un nouveau métallophore. *Thèse soutenue à l'université Joseph Fourier Grenoble I*.
- Cherrier, M. V., Martin, L., Cavazza, C., Jacquamet, L., Lemaire, D., Gaillard, J. & Fontecilla-Camps, J. C. (2005). Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H₂O)- to the periplasmic nickel transporter NikA. *J Am Chem Soc* 127, 10075-10082.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (1999). NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein. *Protein Sci* 8, 2494-2500.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2000). Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni²⁺-Dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem* 275, 19735-19741.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2002). NikR repressor: high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA. *Chem Biol* 9, 1141-1148.

- Chivers, P. T. & Tahirov, T. H. (2005). Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol* 348, 597-607.
- Chou, C. J., Wisedchaisri, G., Monfeli, R. R., Oram, D. M., Holmes, R. K., Hol, W. G. & Beeson, C. (2004). Functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* iron-dependent regulator. *J Biol Chem* 279, 53554-53561.
- Clugston, S. L., Barnard, J. F., Kinach, R., Miedema, D., Ruman, R., Daub, E. & Honek, J. F. (1998). Overproduction and characterization of a dimeric non-zinc glyoxalase I from *Escherichia coli*: evidence for optimal activation by nickel ions. *Biochemistry* 37, 8754-8763.
- Clugston, S. L., Yajima, R. & Honek, J. F. (2004). Investigation of metal binding and activation of *Escherichia coli* glyoxalase I: kinetic, thermodynamic and mutagenesis studies. *Biochem J* 377, 309-316.
- Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Labigne, A. (2003). Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 49, 947-963.
- Cook, W. J., Kar, S. R., Taylor, K. B. & Hall, L. M. (1998). Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J Mol Biol* 275, 337-346.
- Coy, M. & Neilands, J. B. (1991). Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 30, 8201-8210.
- Coy, M., Doyle, C., Besser, J. & Neilands, J. B. (1994). Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biomaterials* 7, 292-298.
- Danielli, A., Roncarati, D., Delany, I., Chiarini, V., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2006). In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J Bacteriol* 188, 4654-4662.
- D'Aquino, J. A., Tetenbaum-Novatt, J., White, A., Berkovitch, F. & Ringe, D. (2005). Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18408-18413.
- D'Autreaux, B., Pecqueur, L., de Peredo, A. G., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E. & Michaud-Soret, I. (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* 46, 1329-1342.
- Davis, G. S., Flannery, E. L. & Mobley, H. L. (2006). *Helicobacter pylori* HP1512 is a nickel-responsive NikR-regulated outer membrane protein. *Infect Immun* 74, 6811-6820.
- Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H. & Jones, K. M. (1986). *Data for Biochemical Research*, Third edn. Oxford: Clarendon Press.
- de Lorenzo, V., Giovannini, F., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1988). Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J Mol Biol* 203, 875-884.
- de Pina, K., Navarro, C., McWalter, L., Boxer, D. H., Price, N. C., Kelly, S. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Wu, L. F. (1995). Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 227, 857-865.
- De Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M. A., Giordano, G. & Wu, L. F. (1999). Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 670-674.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2001). The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 42, 1297-1309.
- Delany, I., Spohn, G., Pacheco, A. B., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2002). Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol Microbiol* 46, 1107-1122.

- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2003). An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 50, 1329-1338.
- Delany, I., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2004). Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 52, 1081-1090.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2005). In vitro analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187, 7703-7715.
- DeWitt, M. A., Kliegman, J. I., Helmann, J. D., Brennan, R. G., Farrens, D. L. & Glasfeld, A. (2007). The conformations of the manganese transport regulator of *Bacillus subtilis* in its metal-free state. *J Mol Biol* 365, 1257-1265.
- Dian, C., Schauer, K., Kapp, U., McSweeney, S. M., Labigne, A. & Terradot, L. (2006). Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol* 361, 715-730.
- Dias, A. V. & Zamble, D. B. (2005). Protease digestion analysis of *Escherichia coli* NikR: evidence for conformational stabilization with Ni(II). *J Biol Inorg Chem* 10, 605-612.
- Diaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D. & Johnston, A. W. (2004). The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* 150, 1447-1456.
- Ding, X., Zeng, H., Schiering, N., Ringe, D. & Murphy, J. R. (1996). Identification of the primary metal ion-activation sites of the diphtheria tox repressor by X-ray crystallography and site-directed mutational analysis. *Nat Struct Biol* 3, 382-387.
- Dosanjh, N. S. & Michel, S. L. (2006). Microbial nickel metalloregulation: NikRs for nickel ions. *Curr Opin Chem Biol* 10, 123-130.
- Dosanjh, N. S., Hammerbacher, N. A. & Michel, S. L. (2007). Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA) DNA interaction: metal ion requirements and sequence specificity. *Biochemistry* 46, 2520-2529.
- Eicken, C., Pennella, M. A., Chen, X., Koshlap, K. M., VanZile, M. L., Sacchettini, J. C. & Giedroc, D. P. (2003). A metal-ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins. *J Mol Biol* 333, 683-695.
- Endo, G. & Silver, S. (1995). CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* 177, 4437-4441.
- Erbe, J. L., Taylor, K. B. & Hall, L. M. (1995). Metalloregulation of the cyanobacterial smt locus: identification of SmtB binding sites and direct interaction with metals. *Nucleic Acids Res* 23, 2472-2478.
- Ernst, F. D., Bereswill, S., Waidner, B. & other authors (2005a). Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology* 151, 533-546.
- Ernst, F. D., Homuth, G., Stoof, J. & other authors (2005b). Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol* 187, 3687-3692.
- Ernst, F. D., Kuipers, E. J., Heijens, A., Sarwari, R., Stoof, J., Penn, C. W., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2005c). The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 73, 7252-7258.
- Ernst, F. D., Stoof, J., Horrevoets, W. M., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2006). NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun* 74, 6821-6828.

- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1998). Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* 283, 537-547.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181, 6223-6229.
- Fuentes, A. M., Diaz-Mejia, J. J., Maldonado-Rodriguez, R. & Amabile-Cuevas, C. F. (2001). Differential activities of the SoxR protein of *Escherichia coli*: SoxS is not required for gene activation under iron deprivation. *FEMS Microbiol Lett* 201, 271-275.
- Fulkerson, J. F., Jr. & Mobley, H. L. (2000). Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. *J Bacteriol* 182, 1722-1730.
- Ge, R., Watt, R. M., Sun, X., Tanner, J. A., He, Q. Y., Huang, J. D. & Sun, H. (2006a). Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*. *Biochem J* 393, 285-293.
- Ge, R., Zhang, Y., Sun, X., Watt, R. M., He, Q. Y., Huang, J. D., Wilcox, D. E. & Sun, H. (2006b). Thermodynamic and kinetic aspects of metal binding to the histidine-rich protein, Hpn. *J Am Chem Soc* 128, 11330-11331.
- Gilbert, J. V., Ramakrishna, J., Sunderman, F. W., Jr., Wright, A. & Plaut, A. G. (1995). Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun* 63, 2682-2688.
- Glasfeld, A., Guedon, E., Helmann, J. D. & Brennan, R. G. (2003). Structure of the manganese-bound manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Biol* 10, 652-657.
- Godsey, M. H., Baranova, N. N., Neyfakh, A. A. & Brennan, R. G. (2001). Crystal structure of MtnA, a global multidrug transporter gene activator. *J Biol Chem* 276, 47178-47184.
- Golynskiy, M. V., Davis, T. C., Helmann, J. D. & Cohen, S. M. (2005). Metal-induced structural organization and stabilization of the metalloregulatory protein MntR. *Biochemistry* 44, 3380-3389.
- Golynskiy, M. V., Gunderson, W. A., Hendrich, M. P. & Cohen, S. M. (2006). Metal Binding Studies and EPR Spectroscopy of the Manganese Transport Regulator MntR. *Biochemistry* 45, 15359-15372.
- Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (1999). Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 38, 8582-8589.
- Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (2001). Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* 310, 83-91.
- Grant, G. A. (2006). The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *J Biol Chem* 281, 33825-33829.
- Gruber, T. M. & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57, 441-466.
- Guedon, E. & Helmann, J. D. (2003). Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators. *Mol Microbiol* 48, 495-506.
- Ha, N. C., Oh, S. T., Sung, J. Y., Cha, K. A., Lee, M. H. & Oh, B. H. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol* 8, 505-509.
- Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R. & O'Brian, M. R. (1998). The bacterial irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem* 273, 21669-21674.

- Hantke, K. (1981). Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182, 288-292.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 172-177.
- Hazlett, K. R., Rusnak, F., Kehres, D. G., Bearden, S. W., La Vake, C. J., La Vake, M. E., Maguire, M. E., Perry, R. D. & Radolf, J. D. (2003). The *Treponema pallidum* tro operon encodes a multiple metal transporter, a zinc-dependent transcriptional repressor, and a semi-autonomously expressed phosphoglycerate mutase. *J Biol Chem* 278, 20687-20694.
- Heddle, J., Scott, D. J., Unzai, S., Park, S. Y. & Tame, J. R. (2003). Crystal structures of the liganded and unliganded nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 50322-50329.
- Heldwein, E. E. & Brennan, R. G. (2001). Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* 409, 378-382.
- Hidalgo, E., Leautaud, V. & Dimple, B. (1998). The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. *Embo J* 17, 2629-2636.
- Hobman, J. L., Wilkie, J. & Brown, N. L. (2005). A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. *Biometals* 18, 429-436.
- Hobman, J. L. (2007). MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Mol Microbiol* 63, 1275-1278.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54, 499-518.
- Iwig, J. S., Rowe, J. L. & Chivers, P. T. (2006). Nickel homeostasis in *Escherichia coli* - the rcnR-rcnA efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol Microbiol* 62, 252-262.
- Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1998). X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 2564-2571.
- Kansau, I., Guillain, F., Thiberge, J. M. & Labigne, A. (1996). Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol* 22, 1013-1023.
- Kar, S. R., Adams, A. C., Lebowitz, J., Taylor, K. B. & Hall, L. M. (1997). The cyanobacterial repressor SmtB is predominantly a dimer and binds two Zn²⁺ ions per subunit. *Biochemistry* 36, 15343-15348.
- Kim, J. S., Kang, S. O. & Lee, J. K. (2003). The protein complex composed of nickel-binding SrmQ and DNA binding motif-bearing SrmR of *Streptomyces griseus* represses sodF transcription in the presence of nickel. *J Biol Chem* 278, 18455-18463.
- Kliegman, J. I., Griner, S. L., Helmann, J. D., Brennan, R. G. & Glasfeld, A. (2006). Structural basis for the metal-selective activation of the manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 45, 3493-3505.
- Knight, K. L. & Sauer, R. T. (1989). DNA binding specificity of the Arc and Mnt repressors is determined by a short region of N-terminal residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 797-801.
- Koch, D., Nies, D. H. & Grass, G. (2007). The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: A connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals* 20, 759-771.
- Kulkarni, R. D. & Summers, A. O. (1999). MerR cross-links to the alpha, beta, and sigma 70 subunits of RNA polymerase in the preinitiation complex at the merTPCAD promoter. *Biochemistry* 38, 3362-3368.
- Lavrrar, J. L., Christoffersen, C. A. & McIntosh, M. A. (2002). Fur-DNA interactions at the bidirectional fepDGC-entS promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 322, 983-995.

- Lavrrar, J. L. & McIntosh, M. A. (2003). Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* 185, 2194-2202.
- Leach, M. R. & Zamble, D. B. (2007). Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 11, 159-165.
- Leach, M. R., Zhang, J. W. & Zamble, D. B. (2007). The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* 282, 16177-16186.
- Lee, H. W., Choe, Y. H., Kim, D. K., Jung, S. Y. & Lee, N. G. (2004). Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics* 4, 2014-2027.
- Lee, J. H. & Holmes, R. K. (2000). Characterization of specific nucleotide substitutions in DtxR-specific operators of *Corynebacterium diphtheriae* that dramatically affect DtxR binding, operator function, and promoter strength. *J Bacteriol* 182, 432-438.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006a). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363-367.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006b). Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* 281, 23567-23578.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20, 485-499.
- Leitch, S., Bradley, M. J., Rowe, J. L., Chivers, P. T. & Maroney, M. J. (2007). Nickel-specific response in the transcriptional regulator, *Escherichia coli* NikR. *J Am Chem Soc* 129, 5085-5095.
- Lewin, A. C., Doughty, P. A., Flegg, L., Moore, G. R. & Spiro, S. (2002). The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology* 148, 2449-2456.
- Lieser, S. A., Davis, T. C., Helmann, J. D. & Cohen, S. M. (2003). DNA-binding and oligomerization studies of the manganese(II) metalloregulatory protein MntR from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 42, 12634-12642.
- Linton, K. J. & Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* 28, 5-13.
- Liu, T., Nakashima, S., Hirose, K., Shibasaki, M., Katsuhara, M., Ezaki, B., Giedroc, D. P. & Kasamo, K. (2004). A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPx-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *J Biol Chem* 279, 17810-17818.
- Liu, T., Golden, J. W. & Giedroc, D. P. (2005). A zinc(II)/lead(II)/cadmium(II)-inducible operon from the *Cyanobacterium anabaena* is regulated by AztR, an alpha3N ArsR/SmtB metalloregulator. *Biochemistry* 44, 8673-8683.
- Love, J. F., vanderSpek, J. C., Marin, V., Guerrero, L., Logan, T. M. & Murphy, J. R. (2004). Genetic and biophysical studies of diphtheria toxin repressor (DtxR) and the hyperactive mutant DtxR(E175K) support a multistep model of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2506-2511.
- Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W. & Pohl, E. (2007). Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 282, 9914-9922.
- Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, G. M. & other authors (2007). Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* 189, 730-740.
- Maier, R. J., Fu, C., Gilbert, J., Moshiri, F., Olson, J. & Plaut, A. G. (1996). Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 141, 71-76.

- Maier, R. J., Benoit, S. L. & Seshadri, S. (2007). Nickel-binding and accessory proteins facilitating Ni-enzyme maturation in *Helicobacter pylori*. *Biometals* 20, 655-664.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4620-4625.
- Masse, E. & Arguin, M. (2005). Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* 30, 462-468.
- Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G. & Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol* 10, 140-145.
- Mehta, N., Olson, J. W. & Maier, R. J. (2003). Characterization of *Helicobacter pylori* nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase. *J Bacteriol* 185, 726-734.
- Meier, F. (2005). Expression du système de transport Nik spécifique du nickel chez *Escherichia coli*. Thèse soutenue à l'université Claude Bernard Lyon I.
- Mobley, H. L., Garner, R. M. & Bauerfeind, P. (1995). *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol* 16, 97-109.
- Morby, A. P., Turner, J. S., Huckle, J. W. & Robinson, N. J. (1993). SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene smtA: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 21, 921-925.
- Mowbray, S. L. & Sandgren, M. O. (1998). Chemotaxis receptors: a progress report on structure and function. *J Struct Biol* 124, 257-275.
- Navarro, C., Wu, L. F. & Mandrand-Berthelot, M. A. (1993). The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* 9, 1181-1191.
- Newberry, K. J. & Brennan, R. G. (2004). The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *J Biol Chem* 279, 20356-20362.
- O'Halloran, T. V., Frantz, B., Shin, M. K., Ralston, D. M. & Wright, J. G. (1989). The MerR heavy metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. *Cell* 56, 119-129.
- Olson, J. W., Fu, C. & Maier, R. J. (1997). The HypB protein from *Bradyrhizobium japonicum* can store nickel and is required for the nickel-dependent transcriptional regulation of hydrogenase. *Mol Microbiol* 24, 119-128.
- Olson, J. W. & Maier, R. J. (2000). Dual roles of *Bradyrhizobium japonicum* nickelin protein in nickel storage and GTP-dependent Ni mobilization. *J Bacteriol* 182, 1702-1705.
- Olson, J. W., Mehta, N. S. & Maier, R. J. (2001). Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 39, 176-182.
- Olson, J. W. & Maier, R. J. (2002). Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science* 298, 1788-1790.
- Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E. & O'Halloran, T. V. (2001). Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* 40, 10417-10423.
- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J. & O'Halloran, T. V. (2000). Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem* 275, 31024-31029.
- Pecqueur, L. (2005). Etude du rôle du zinc et des cystéines dans la dimérisation de la protéine FUR d'*E.coli* : une approche structurale par RMN. Thèse soutenue à l'université Joseph Fourier Grenoble I.

- Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. & Bersch, B. (2006). Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 281, 21286-21295.
- Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2005). Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals* 18, 413-428.
- Pflock, M., Kennard, S., Delany, I., Scarlato, V. & Beier, D. (2005). Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 73, 6437-6445.
- Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkopf, H., Meyer, T. F. & Beier, D. (2006a). Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J Bacteriol* 188, 3449-3462.
- Pflock, M., Kennard, S., Finsterer, N. & Beier, D. (2006b). Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biotechnol* 126, 52-60.
- Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1998). Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* 273, 22420-22427.
- Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1999a). Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain. *J Mol Biol* 292, 653-667.
- Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1999b). Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* 285, 1145-1156.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47, 903-915.
- Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J. & Gherardini, F. C. (1999). Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10887-10892.
- Que, Q. & Helmann, J. D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* 35, 1454-1468.
- Rhodijs, V. A. & Busby, S. J. (1998). Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol* 1, 152-159.
- Rodrigue, A., Effantin, G. & Mandrand-Berthelot, M. A. (2005). Identification of rcnA (yohM), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 2912-2916.
- Rowe, J. L., Starnes, G. L. & Chivers, P. T. (2005). Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 6317-6323.
- Rudolph, G., Hennecke, H. & Fischer, H. M. (2006a). Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* 30, 631-648.
- Rudolph, G., Semini, G., Hauser, F., Lindemann, A., Friberg, M., Hennecke, H. & Fischer, H. M. (2006b). The Iron control element, acting in positive and negative control of iron-regulated *Bradyrhizobium japonicum* genes, is a target for the Irr protein. *J Bacteriol* 188, 733-744.
- Sachs, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., Scott, D. R. & Melchers, K. (2005). Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology (Bethesda)* 20, 429-438.
- Sadhale, P., Verma, J. & Naorem, A. (2007). Basal transcription machinery: role in regulation of stress response in eukaryotes. *J Biosci* 32, 569-578.
- Scarlato, V., Delany, I., Spohn, G. & Beier, D. (2001). Regulation of transcription in *Helicobacter pylori*: simple systems or complex circuits? *Int J Med Microbiol* 291, 107-117.

- Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A. & de Reuse, H. (2007). Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* 63, 1054-1068.
- Schiering, N., Tao, X., Zeng, H., Murphy, J. R., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1995). Structures of the apo- and the metal ion-activated forms of the diphtheria toxin repressor from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9843-9850.
- Schmitt, M. P., Predich, M., Doukhan, L., Smith, I. & Holmes, R. K. (1995). Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* 63, 4284-4289.
- Schmitt, M. P. (1997). Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae* hmuO gene is regulated by iron and heme. *Infect Immun* 65, 4634-4641.
- Schmitt, M. P. (2002). Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn(2+)-dependent mechanism. *J Bacteriol* 184, 6882-6892.
- Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T. & Drennan, C. L. (2003). Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* 10, 794-799.
- Schreiter, E. R., Wang, S. C., Zamble, D. B. & Drennan, C. L. (2006). NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13676-13681.
- Scott, D. R., Marcus, E. A., Wen, Y., Oh, J. & Sachs, G. (2007). Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7235-7240.
- Semavina, M., Beckett, D. & Logan, T. M. (2006). Metal-linked dimerization in the iron-dependent regulator from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 45, 12480-12490.
- Sen, K. I., Sienkiewicz, A., Love, J. F., vanderSpek, J. C., Fajer, P. G. & Logan, T. M. (2006). Mn(II) binding by the anthrax repressor from *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* 45, 4295-4303.
- Seshadri, S., Benoit, S. L. & Maier, R. J. (2007). Roles of His-rich hpn and hpn-like proteins in *Helicobacter pylori* nickel physiology. *J Bacteriol* 189, 4120-4126.
- Shewchuk, L. M., Verdine, G. L., Nash, H. & Walsh, C. T. (1989a). Mutagenesis of the cysteines in the metalloregulatory protein MerR indicates that a metal-bridged dimer activates transcription. *Biochemistry* 28, 6140-6145.
- Shewchuk, L. M., Verdine, G. L. & Walsh, C. T. (1989b). Transcriptional switching by the metalloregulatory MerR protein: initial characterization of DNA and mercury (II) binding activities. *Biochemistry* 28, 2331-2339.
- Shirai, M., Fujinaga, R., Akada, J. K. & Nakazawa, T. (1999). Activation of *Helicobacter pylori* ureA promoter by a hybrid *Escherichia coli*-H. pylori rpoD gene in E. coli. *Gene* 239, 351-359.
- Silver, S. & Phung le, T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 587-605.
- Spiering, M. M., Ringe, D., Murphy, J. R. & Marletta, M. A. (2003). Metal stoichiometry and functional studies of the diphtheria toxin repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3808-3813.
- Stahler, F. N., Odenbreit, S., Haas, R., Wilrich, J., Van Vliet, A. H., Kusters, J. G., Kist, M. & Bereswill, S. (2006). The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infect Immun* 74, 3845-3852.

- Stanisich, V. A., Bennett, P. M. & Richmond, M. H. (1977). Characterization of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 129, 1227-1233.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. & Brown, N. L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39, 502-511.
- Stoyanov, J. V. & Brown, N. L. (2003). The *Escherichia coli* copper-responsive copA promoter is activated by gold. *J Biol Chem* 278, 1407-1410.
- Summers, A. O. (1992). Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 174, 3097-3101.
- Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (2005). Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* 579, 5454-5460.
- Torreilles, J. & Guerin, M. C. (1990). Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 272, 58-60.
- Torreilles, J., Guerin, M. C. & Slaoui-Hasnaoui, A. (1990). Nickel (II) complexes of histidyl-peptides as Fenton-reaction catalysts. *Free Radic Res Commun* 11, 159-166.
- Traore, D. A., El Ghazouani, A., Ilango, S., Dupuy, J., Jacquamet, L., Ferrer, J. L., Caux-Thang, C., Duarte, V. & Latour, J. M. (2006). Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 61, 1211-1219.
- van Vliet, A. H., Poppelaars, S. W., Davies, B. J., Stoof, J., Bereswill, S., Kist, M., Penn, C. W., Kuipers, E. J. & Kusters, J. G. (2002). NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 70, 2846-2852.
- van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Stoof, J., Poppelaars, S. W. & Kusters, J. G. (2004). Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect Immun* 72, 766-773.
- VanZile, M. L., Chen, X. & Giedroc, D. P. (2002a). Allosteric negative regulation of smt O/P binding of the zinc sensor, SmtB, by metal ions: a coupled equilibrium analysis. *Biochemistry* 41, 9776-9786.
- VanZile, M. L., Chen, X. & Giedroc, D. P. (2002b). Structural characterization of distinct alpha3N and alpha5 metal sites in the cyanobacterial zinc sensor SmtB. *Biochemistry* 41, 9765-9775.
- Vassinova, N. & Kozyrev, D. (2000). A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146 Pt 12, 3171-3182.
- Wang, G., Wylie, G. P., Twigg, P. D., Caspar, D. L., Murphy, J. R. & Logan, T. M. (1999). Solution structure and peptide binding studies of the C-terminal src homology 3-like domain of the diphtheria toxin repressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6119-6124.
- Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10018-10028.
- Wang, Y., Hemmingsen, L. & Giedroc, D. P. (2005). Structural and functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CmtR, a PbII/CdII-sensing SmtB/ArsR metalloregulatory repressor. *Biochemistry* 44, 8976-8988.
- Wen, Y., Feng, J., Scott, D. R., Marcus, E. A. & Sachs, G. (2006). Involvement of the HP0165-HP0166 two-component system in expression of some acidic-pH-upregulated genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188, 1750-1761.

- White, A., Ding, X., vanderSpek, J. C., Murphy, J. R. & Ringe, D. (1998). Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* 394, 502-506.
- Wisedchaisri, G., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (2004). Crystal structure of an IdeR-DNA complex reveals a conformational change in activated IdeR for base-specific interactions. *J Mol Biol* 342, 1155-1169.
- Wisedchaisri, G., Chou, C. J., Wu, M., Roach, C., Rice, A. E., Holmes, R. K., Beeson, C. & Hol, W. G. (2007). Crystal structures, metal activation, and DNA-binding properties of two-domain IdeR from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 46, 436-447.
- Wolfram, L., Haas, E. & Bauerfeind, P. (2006). Nickel represses the synthesis of the nickel permease NixA of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188, 1245-1250.
- Wosten, M. M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* 22, 127-150.
- Wu, J. & Rosen, B. P. (1991). The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Mol Microbiol* 5, 1331-1336.
- Wu, J. & Rosen, B. P. (1993). Metalloregulated expression of the ars operon. *J Biol Chem* 268, 52-58.
- Wu, L. F. & Mandrand-Berthelot, M. A. (1986). Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie* 68, 167-179.
- Wu, L. F., Navarro, C. & Mandrand-Berthelot, M. A. (1991). The hydC region contains a multi-cistronic operon (nik) involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene* 107, 37-42.
- Wylie, G. P., Rangachari, V., Bienkiewicz, E. A., Marin, V., Bhattacharya, N., Love, J. F., Murphy, J. R. & Logan, T. M. (2005). Prolylpeptide binding by the prokaryotic SH3-like domain of the diphtheria toxin repressor: a regulatory switch. *Biochemistry* 44, 40-51.
- Yang, J., Panek, H. R. & O'Brian, M. R. (2006a). Oxidative stress promotes degradation of the Irr protein to regulate haem biosynthesis in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* 60, 209-218.
- Yang, J., Sangwan, I., Lindemann, A., Hauser, F., Hennecke, H., Fischer, H. M. & O'Brian, M. R. (2006b). *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol Microbiol* 60, 427-437.
- Ye, J., Kandegedara, A., Martin, P. & Rosen, B. P. (2005). Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pI258 CadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor. *J Bacteriol* 187, 4214-4221.
- Zeng, Q., Stalhandske, C., Anderson, M. C., Scott, R. A. & Summers, A. O. (1998). The core metal-recognition domain of MerR. *Biochemistry* 37, 15885-15895.
- Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A. & Zamble, D. B. (2005). A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 280, 4360-4366.

Chapitre II

Les propriétés d'EcNi \mathcal{R}

II.1. Les fondements de l'étude d'EcNikR

L'objectif premier de cette étude était de comprendre le ou les mécanismes impliqués dans la spécificité ionique de EcNikR ; comme FUR, NikR était décrite comme activable par différents ions métalliques *in vitro* (Wang *et al.*, 2004). Pour ce faire une caractérisation de ses propriétés de liaison métallique était nécessaire (stoechiométrie, affinité pour le métal, cinétique de liaison). Ce travail, comme nous allons le voir par la suite, a permis de mettre en avant une caractéristique de la protéine peu explicitée dans la littérature, sa capacité d'agrégation, ainsi que de remettre en question certains travaux publiés antérieurement (K_{dNi} du site de haute affinité). Différentes caractéristiques de métallation d'EcNikR décrites dans la littérature qui ont attiré notre attention, vont être présentées ci-dessous avant l'exposé de nos résultats.

II.1.1. La métallation d'EcNikR par le nickel

NikR d'*Escherichia coli*, *in vitro*, est capable de lier différents métaux dont le nickel (Wang *et al.*, 2004). D'après la littérature la liaison de ce métal aurait lieu dans deux classes de sites : un site dit de haute affinité pour le nickel (site 1 ou spectroscopique) et un site dit de basse affinité (site 2).

La liaison du nickel dans le site dit de haute affinité peut être suivie en spectroscopie d'absorption UV-Visible (Chivers & Sauer, 2000). Il en résulte des bandes caractéristiques avec d'une part la bande de transfert de charge (Cys $S^\gamma \rightarrow Ni(II)$) à 302 nm et une bande d-d à 460 nm (Figure II.1A-B).

Ce site lie jusqu'à 1 équivalent de nickel ajouté par monomère. Expérimentalement ceci se traduit par une métallation qui s'effectue linéairement jusqu'à approximativement 1 équivalent de nickel ajouté par monomère de protéine (Figure II.1C).

Dans ces conditions, il est possible de déterminer le coefficient d'extinction apparent ($\epsilon_{apparent}$) du complexe Ni-EcNikR en se basant sur la relation de Beer-Lambert. Ce dernier est caractéristique de l'espèce et est invariable sur un système à l'équilibre.

Toutefois différents groupes ayant contribué à la caractérisation biochimique de EcNikR ont observé des coefficients variables allant de 3200 à 7200 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002; Wang *et al.*, 2004). Cette valeur fluctue non seulement entre différentes équipes, mais aussi au sein d'un même groupe.

Un second événement est observé au-delà de 1 équivalent de nickel ajouté à la protéine, en effet cette dernière s'agrège (Figure II.1A). Curieusement dans la littérature, cet état n'est que vaguement évoqué (Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002; Wang *et al.*, 2004). Il est dit que la protéine précipite en présence d'un large excès de métal (Chivers & Sauer, 2000), pour limiter son impact sur les mesures expérimentales, il est proposé d'ajouter de la glycine, du NTA (chélateur) ou de centrifuger l'échantillon (perte de protéine). Cependant cet excès est « très relatif » dans la mesure où il s'agit de plus de 1 équivalent de métal ajouté. Cet état d'agrégation se traduit par une augmentation générale de l'absorption (Figure II.1A et C). Il pourrait être corrélé à la métallation de sites annexes de la protéine (site 2). Cette agrégation peut être contrôlée en présence de chélateur plus ou moins fort. En absence d'un tel composé, la détermination de l'affinité et l'étude de la spécificité ionique ne sont pas envisageables. Une caractérisation de ce phénomène ainsi qu'une étude pour déterminer des conditions limitant ce comportement ont donc été faites et seront présentées par la suite.

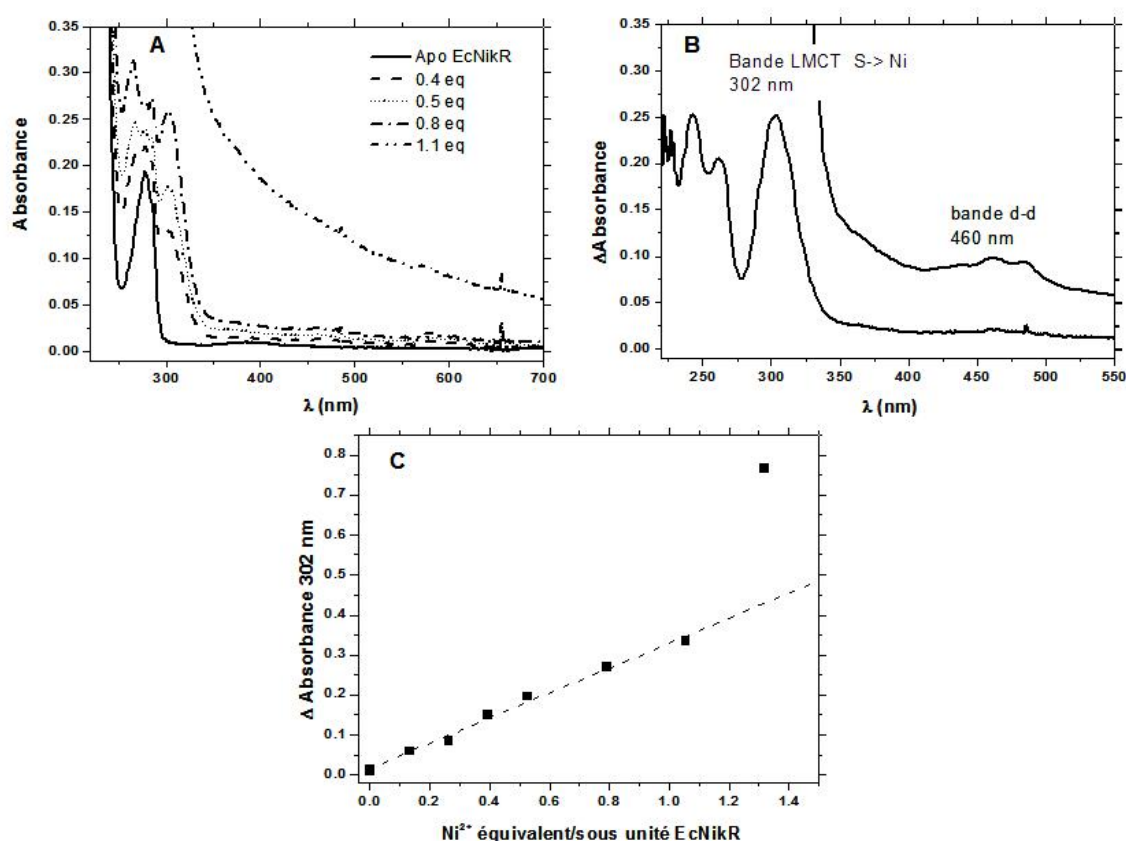


Figure II.1 Métallation de EcNikR par le nickel. A) Spectres d'absorption UV-Vis de EcNikR à 40µM à l'état apo et en présence de différents équivalents de nickel. B) Spectre de différence entre Ni-EcNikR (0.8 eq de Ni(II)) et apo-EcNikR. C) Titration de EcNikR par le nickel, suivi de l'absorption à 302nm en fonction de la quantité de nickel ajoutée. Conditions : 20mM HEPES pH 8, 100mM NaCl 20°C, Sel métallique : NiSO₄.

Un dernier aspect de la caractérisation des propriétés de métallation d'EcNikR a attiré notre attention, il s'agit de la technique employée pour déterminer l'affinité de la protéine pour le nickel.

II.1.2. Une affinité de l'ordre du picomolaire ?

L'affinité du site dit de haute affinité pour le nickel a été décrite comme étant de l'ordre du picomolaire. Afin de la mesurer, une technique de dosage indirecte nécessitant une compétition entre la protéine et l'EGTA a été utilisée dans les travaux publiés antérieurement (Chivers & Sauer, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Ce dosage consiste en l'incubation d'EcNikR avec des concentrations croissantes de nickel dans un tampon contenant de l'EGTA en excès. Après au moins 30 minutes d'incubation à 20°C, la fraction de métal liée à la protéine est déterminée en fonction de l'absorbance à 302nm ainsi que de l'épsilon du complexe Ni-EcNikR déterminé au préalable. La quantité de métal libre est ensuite calculée. Cette détermination implique de tenir compte de différents paramètres parmi lesquels on retrouve la concentration de chélateur ajouté ainsi que l'affinité relative de ce dernier pour le métal dans les conditions expérimentales utilisées.

Il s'avère que les deux groupes, ayant mesuré un K_d de l'ordre du pM pour EcNikR, ont tous les deux utilisé de l'EGTA. Ce dernier est pourtant présenté comme étant un chélateur inapproprié pour l'étude de la complexation du nickel (Martell & Smith, 1974) et la constante de dissociation de l'EGTA pour le nickel considérée dans ces deux travaux diffère ($3.16.10^{-14}$ M (Chivers & Sauer, 2002) et $5.21.10^{-11}$ M (Wang *et al.*, 2004)). De plus, l'épsilon considéré, pour déterminer la quantité de métal liée par la protéine, diffère entre les groupes.

Ces trois points laissent envisager que la technique utilisée pour déterminer ce K_d n'était pas appropriée et que le K_d déterminé ainsi n'est qu'apparent et n'est pas réellement représentatif du comportement de NikR vis-à-vis du nickel.

C'est pourquoi nous avons choisi de redéterminer l'affinité de la protéine EcNikR pour le nickel en utilisant des mesures directes comme nous le verrons par la suite.

II.1.3. Une caractérisation en deux temps

L'étude des propriétés de métallation et d'agrégation d'EcNikR en fonction de la concentration en nickel a été réalisée sur deux protéines : EcNikR sauvage notée EcNikR WT et EcNikR mutée notée EcNikR Q2E. La mutation porte sur le second résidu de la protéine (Gln2 → Glu2) présent dans le domaine de liaison à l'ADN.

Dans un premier temps, les propriétés du mutant EcNikR Q2E, fourni par le laboratoire de Microbiologie Adaptation et Pathogénie (MAP) de l'UCB Lyon I, ont été étudiées par Rutger Diederix, qui était en stage postdoctoral au laboratoire.

Lors de son étude, il a montré par spectroscopie d'absorption UV-Vis et par mesure de la cinétique de métallation que le mutant EcNikR Q2E ne présentait pas pour le site dit de haute affinité un K_d de l'ordre du picomolaire. Il a par ailleurs déterminé le coefficient d'extinction molaire du complexe Ni-EcNikR à 302nm par extrapolation et obtenu une valeur de $10400 \pm 300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Il s'est également intéressé à l'agrégation de EcNikR Q2E qui fait suite à la métallation du site de haute affinité. Il a montré que cette dernière est maximale pour 1,5 équivalents de nickel ajoutés par monomère et qu'elle est réversible « rapidement » en présence d'EDTA.

Dans un second temps, pour valider l'ensemble des travaux réalisés sur le mutant (capacité de métallation, agrégation, affinité pour le nickel), de nombreux contrôles ont été réalisés sur EcNikR WT. Cet aspect de l'étude a constitué une partie de mes travaux de thèse. Après réversion de la mutation, la production et la purification d'EcNikR sauvage (WT) ont été réalisées *via* un nouveau protocole (Fauquant *et al.*, 2006). Il s'est avéré qu'EcNikR WT pouvait être purifiée comme EcNikR Q2E, c'est-à-dire sur une colonne d'affinité chargée en Ni(II) sans qu'aucune addition supplémentaire de ce métal ne soit nécessaire à la différence des protocoles décrits dans la littérature. Toutefois afin de se soustraire à une éventuelle métallation de la protéine, un nouveau protocole consistant en l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions suivie d'une colonne d'exclusion moléculaire a été préféré.

Une troisième technique, la liaison sur filtre, a été employée afin de mesurer et de confirmer l'affinité d'EcNikR Q2E et WT pour le nickel. Rutger Diederix a réalisé les ajustements de ces expériences.

Afin de déterminer des conditions expérimentales pour faciliter la caractérisation d'EcNikR, une étude portant sur l'effet du pH sur les propriétés de métallation et d'agrégation de EcNikR a été réalisée. Une étude comparable a été faite sur son homologue chez *H. pylori*.

Les différents résultats obtenus sur EcNikR Q2E et WT vont être présentés.

II.2. L'affinité de EcNikR pour le nickel : Sous-micromolaire !

Afin de redéterminer l'affinité d'EcNikR pour le nickel, trois techniques directes ont été employées :

- La spectroscopie d'absorption UV-Visible en suivant l'absorbance à 302nm qui est caractéristique de la métallation par le nickel au site dit spectroscopique
- La cinétique rapide de la métallation (suivie de l'absorbance à 302nm dans le temps)
- La liaison sur filtre en mesurant la quantité totale de $^{63}\text{Ni(II)}$ liée à la protéine

Les deux premières techniques ont permis de mesurer l'affinité apparente du site de haute affinité pour le nickel.

La technique de liaison sur filtre ou « FBA », quant à elle, a non seulement permis de déterminer le nombre total de sites métalliques par unité monomérique de protéine mais aussi de déterminer un K_d apparent pour le site de haute affinité et pour les sites de plus basses affinités.

L'ensemble de ce travail est décrit dans une communication qui est actuellement soumise à publication et qui est présentée à la suite.

Nos résultats suggèrent que EcNikR WT et Q2E présentent un K_d sous-micromolaire pour le site de haute affinité (K_D moyen de 82 ± 24 nM par FBA, 379nM par titration en UV-Vis à l'équilibre et 363nM par cinétique rapide) contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. Par ailleurs, nos données suggèrent que la métallation du site de haute affinité s'effectue selon un mécanisme en deux temps avec la formation d'un premier complexe [EcNikR-Ni] intermédiaire n'ayant pas de signature UV-Visible. Le cluster d'histidines présent à l'embouchure du site de haute affinité pourrait constituer ce premier « site » dont la métallation serait transitoire.

Communication soumise : **Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II)**

Le matériel supplémentaire constitue l'Annexe A.

Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II)

Rutger E. M. Diederix^{1,2,✉}, Caroline Fauquant¹, Agnès Rodrigue³, Marie-Andrée Mandrand-Berthelot³, and Isabelle Michaud-Soret^{1,✉}

(1) a) CNRS, UMR 5249, 17 avenue des martyrs, Grenoble F-38054 cedex 9 ; b) CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble F-38054 cedex 9; c) Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38000, France.

(2) Current address: Instituto Química Física “Rocasolano”, CSIC, Madrid, Spain.

(3) Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, CNRS-UCB-INSA-BayerCropScience, Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

✉ Isabelle Michaud-Soret

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux

iRTSV/CEA-Grenoble, Bâtiment C5

17 Avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

e-mail imichaud@cea.fr

Fax + 33 4 38 78 34 62

✉ Rutger E.M. Diederix

Instituto Química Física “Rocasolano”, CSIC,

Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

e-mail diederix@iqfr.csic.es

Fax + 34 91 56 42 431

Summary

Equilibrium and time-dependent binding studies of Ni(II) to the nickel-responsive transcription repressor NikR from *Escherichia coli* are reported. Using UV/vis equilibrium titrations, filter binding assays, and rapid kinetics experiments, respectively, values for the dissociation constant of 0.379, 0.082 and 0.363 μM are found for the Ni(II) in the high affinity site. These values are significantly higher than previously reported picomolar values. The values reported here are more in line with the dissociation constants normally associated with Ni(II)-binding proteins. Ni(II) binding follows two-step binding kinetics with binding rates $k_{\text{on}} = 1.76 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, and $k_{\text{off}} = 0.0064 \text{ s}^{-1}$.

Text of the report

NikR is a Ni(II)-responsive transcription factor that regulates levels of Ni(II) in *E. coli* and other bacteria such as *Helicobacter pylori* [1-3]. In *E. coli*, NikR is involved in nickel homeostasis through Ni(II)-dependent repression of the *nikABCDE* operon, thus suppressing expression of the ABC transporter specific for the import of Ni(II). *E. coli* NikR consists of 133 amino acids, of which 12 are histidines, and forms a tetrameric structure with several Ni(II)-binding sites [4-7]. One of these sites has square planar His₃Cys coordination [5, 8] and is buried at the interface between the two dimer pairs making up the tetramer [4]. A picomolar dissociation constant has previously been ascribed for this high affinity (HA) site, using competition assays [9-11]. This report presents a re-evaluation of the Ni(II) binding properties of *E. coli* NikR using direct measurements:

UV/vis equilibrium titrations, filter binding assays, and rapid kinetics experiments.

Ni(II) binding to the HA site activates NikR for operator binding ($K_D \sim 30$ nM). Ni(II) binds to several other (low affinity, LA) sites, which may number up to 7 per monomer [12]. These are less well characterized, and have lower affinity (0.03-50 μ M) [9-11]. Ni(II) binding to (one of the) LA sites increases the affinity of NikR for DNA about 1000-fold ($K_D \sim 10$ -20 pM) [9-11]. This implies that NikR is sensitive or responsive to two greatly different Ni(II) concentrations, and thus acts at two distinct levels of regulatory control. This feature of NikR is, to our knowledge, unique for a metallo-regulatory protein. The cellular levels of Ni(II) in living *E. coli* cells have been estimated to lie between 10^{-8} and 10^{-6} M [13], and the experimentally determined K_D lies in the low μ M range for many bacterial Ni(II)-binding proteins [14-19]. An apparent inconsistency thus exists between the pM affinity of NikR for Ni(II) on the one hand, and cellular nickel levels and affinities of Ni(II) binding proteins on the other hand. This clearly warrants further investigation, which is reported here. We have chosen for direct titration techniques to study Ni(II) binding by *E. coli* NikR, rather than assays based on chelator-protein competition, which may lead to errors in interpretation (vide infra, and [20]). We find that the HA site of NikR certainly does not have pM affinity for Ni(II), but rather an affinity four orders of magnitude lower, consistent with NikR being responsive to sub-micromolar levels of nickel. Similarly, in a recent study on *Helicobacter pylori* NikR [20], the affinity for Ni(II) as determined by a direct assay (isothermal titration calorimetry) was three orders of magnitude lower than previously determined by competition assays [21].

NikR binds Ni(II) in the HA site with square planar geometry and with cysteine ligation [4, 8], as observed by UV/vis spectroscopy [6, 12]. Increase of the Cys $S^{\gamma} \rightarrow$ Ni LMCT band at 302 nm is linear up to one Ni(II) equivalent, after which mass aggregation is seen, which is complete at less than 1.5 equivalents of Ni(II) [12]. Binding of Ni(II) is still possible by the

aggregate however, between 4 and 7 Ni(II) ions per NikR monomer [12]. No aggregation at all is observed with 0.1 or less equivalents Ni(II) using dynamic light scattering (see Supporting Material). When the concentration of Ni(II) is much lower than that of NikR, Ni(II) binding is approximately linear, and the degree of Ni(II) binding is expected to decrease as the NikR concentration nears the actual K_D of the binding site (see Supporting Material). We thus monitored the linear increase in absorbance at 302 nm as a function of Ni(II) at varying NikR concentrations. The dependence of this ‘apparent extinction coefficient’ on the Q2E NikR concentration is shown in Figure 1, together with a hyperbolic fit to the data (see Experimental Section, eq. 2), giving $K_D = 0.379 \pm 0.068$ μ M and $\epsilon_{302} = 10,400 \pm 300$ $M^{-1}cm^{-1}$. Earlier reports are confusing in this aspect, with ϵ_{302} varying between 3200 and 7200 $M^{-1}cm^{-1}$ [6, 9, 10]. The small differences in absorbance intensities preclude the determination of the apparent extinction coefficient at NikR concentrations lower than 0.6 μ M. Nevertheless, the downward tendency of the apparent extinction coefficient at lower NikR concentration is very clear and it is incompatible with picomolar affinity. At the concentrations applied, NikR remains tetrameric [12].

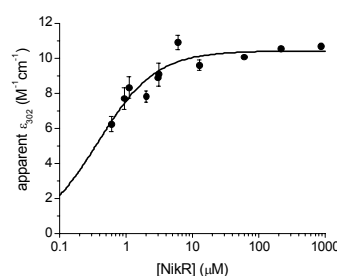


Figure 1. Dependence of the ‘apparent extinction coefficient’ of Ni(II)-bound NikR as a function of Q2E NikR concentration (●). The data were fit (line) to a hyperbolic function (See Supporting Information for details of the fitting procedure). Note that the x-axis is logarithmic.

Ni(II) binding to NikR was also determined using a filter binding assay. The amount of 63 Ni(II) bound as a function of NikR concentration is shown in Figure 2A and B for wt NikR and EDTA-treated wt NikR,

respectively. Q2E NikR shows similar binding (not shown). EDTA-treated NikR contains Ni(II) in only the HA site (as concluded from UV/vis experiments and metal quantification [12]), whereas the non-treated sample also contains Ni(II) bound to other sites [12]. This is because Ni(II) is only very slowly released from the HA site [12]. We also studied the double mutant Q2E/H89N NikR (Fig. 2C and D), which does not bind Ni(II) in the HA site since His89 is missing (indeed, EDTA-washed Q2E/H89N NikR does not retain Ni(II), Fig. 2D).

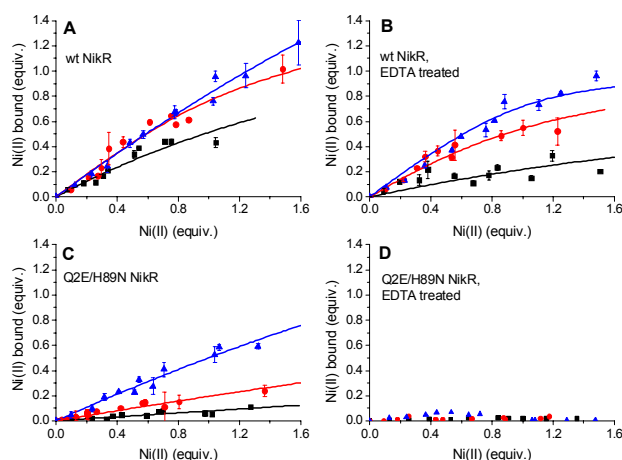


Figure 2. Ni(II) binding by wt NikR (A), wt NikR washed with EDTA (B), Q2E/H89N NikR (C) and Q2E/H89N NikR washed with EDTA (D), respectively, as determined using a filter binding assay. NikR concentration is 0.1 μM (black), 0.2 μM (red) and 0.4 μM (blue). Fits to the data are shown as solid lines.

The data were fit using Dynafit [22], assuming independent binding to two categories of binding sites, each with a different affinity for Ni(II). The HA site is considered one category, while all other sites that are rapidly depleted by EDTA are considered the second category (LA). The best fits to all binding data yield average K_D values of 82 ± 24 nM for the HA site (78.9 and 85.7 nM for the Q2E and wt proteins, respectively) and 2.2 ± 0.7 μM for the LA sites assuming three additional sites per NikR monomer. Note that if a site of pM affinity would be present, a curve with unity slope would be observed up to one Ni(II) equivalent, with no relevant difference between the different protein concentrations used.

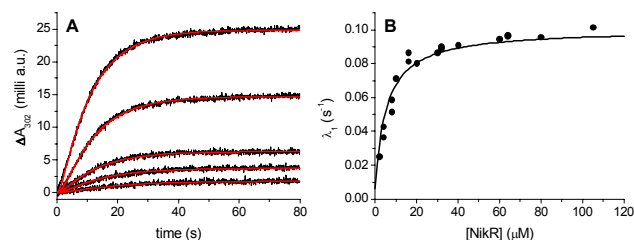
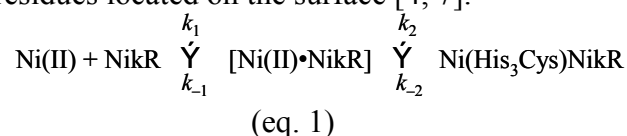


Figure 3. A) Stopped-flow traces of Ni(II) binding by NikR. Here, NikR concentration was 2, 4, 8, 16 and 32 μM and NiSO₄ was 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 μM respectively. The data (black lines), corrected for background absorbance, were fit globally (red lines) to a two-step binding mechanism. B) Exponential rate constants of the slow phase (λ_1) as a function of NikR concentration. The rate constants (●) were derived by fitting the traces to a bi-exponential function. The fast phase (not shown) shows too much scattering to be useful for analysis. The line through the data is a simulation using the kinetic constants obtained via numerical fitting.

We determined the kinetics of Ni(II) binding to the HA site (Fig. 3). Fitting of the stopped-flow traces to a mono-exponential function gives imperfect fits (not shown), with deviations at the beginning of the reactions (i.e. a lag-phase). The approximate rate constants derived from this fitting display a hyperbolic dependence on NikR concentration. Together, this is evidence of a binding mechanism with a colorless intermediate [23, 24]. A two-step binding mechanism (eq. 1) is the most simple and from a structural point of view, the most likely mechanism; the HA site is in the interior of the protein, and the most direct route for Ni(II) to this site is through a cluster of His residues located on the surface [4, 7].



The data were fit globally using Dynafit [22] to this mechanism (see Supporting Material for details), yielding the following values for the kinetic constants: $k_1 = 3.65 (\pm 0.46) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} = 0.095 \pm 0.015 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0.088 \pm 0.016 \text{ s}^{-1}$ and $k_{-2} = 0.0123 \pm 0.0012 \text{ s}^{-1}$ ($k_{\text{on}} = 1.76 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0.0064 \text{ s}^{-1}$). The K_D derived from these values is $0.363 (\pm 0.105) \text{ μM}$.

We clearly show here, using three distinct methods, that NikR binds Ni(II) in the HA site with sub-micromolar affinity. In addition to

this site, Ni(II) also binds to several other sites, with slightly lower affinity. The affinity determined here by direct methods contrasts strongly with the picomolar value previously determined using competition assays [9-11]. A similar difference was observed by Zambelli *et al.* between values obtained through direct and indirect methods with NikR from *H. pylori* [20]. It was argued that the competitor used in these assays, EGTA, may not be innocent: The presence of EGTA inhibits NikR binding to DNA [9] suggesting that it may form ternary complex with NikR and Ni(II) which would affect the apparent dissociation constant of Ni(II)-NikR complex. Further, the value of the stability constant of the Ni-EGTA complex, which is fundamental for calculation of the affinity of the HA site, is subject of disagreement spanning several order of magnitude [25-27]. Finally, we should also mention that when relevant, we have also taken the secondary Ni(II) sites into account. These have only slightly poorer affinity for Ni(II) than the HA site, and obviously, when not accounted for, Ni(II) binding by these sites (cf. Fig. 2A, C and B, D) will lead to an overestimation of the affinity of NikR for Ni(II) in a competition assay.

One can now question the claims that *E. coli* NikR has two distinct affinities for its cognate DNA [9-11], based on whether Ni(II) is bound to the HA sites only, or also to additional site(s). The lower affinity for DNA binding was concluded from experiments performed with an equimolar mixture of Ni(II) and NikR, assuming that NikR was fully saturated with Ni(II). We now know that probably only a fraction of the NikR was saturated with Ni(II) under these conditions. The higher affinity for DNA observed in the presence of excess, micromolar Ni(II) may thus simply correspond to conditions where the HA site is fully occupied.

In the cellular environment, Ni(II) is thought to be present in nM- μ M concentrations. The major Ni(II) binding proteins have approximately μ M affinity for their cofactor [14-19]. It is thus consistent that NikR, a major regulator of nickel levels in the cell,

displays a sensitivity to Ni(II) at micromolar levels. Here we show that this is indeed the case, and that previous estimations of the affinity of NikR for Ni(II) are too high.

Experimental Section

Protein samples The *nikR* gene containing the Q2E mutation, described previously [12], was used as a template for the H89N mutation. The resulting Q2E/H89N mutant (verified by sequencing) was expressed and purified as Q2E NikR, and Q2E and wt NikR were over-expressed and purified as before [12]. Protein concentrations are expressed in monomer units.

UV/vis spectroscopy UV/vis spectra were acquired using a Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer, thermostated at 293 K. Ni(II) titrations were performed with Q2E NikR (between 0.6 and 860 μ M), in 20 mM Hepes pH 8.0, 0.1 M NaCl, 293 K. The samples were allowed to equilibrate for at least 30 min. Depending on the NikR concentration, cuvettes were used with optical path lengths of 0.1, 1 and 10 cm. The 'apparent extinction coefficient' was defined as the linear dependence of absorbance at 302 nm on NiSO₄ concentration. The apparent extinction coefficient shows a hyperbolic dependence on NikR (eq. 2), as justified in the Supporting Material:

$$\varepsilon_{302}(\text{apparent}) = \varepsilon_{302} \cdot \frac{[\text{NikR}]_{\text{tot}}}{(K_d + [\text{NikR}]_{\text{tot}})}$$

(eq. 2)

Filter binding assay Filter binding assays were performed as described [12, 19]. Wt, Q2E and Q2E/H89N NikR were incubated for 45 min at room temperature with varying concentrations of ⁶³NiCl₂, and subsequently immobilized on buffer-equilibrated 0.2 μ m Sequiblot PVDF membranes (Biorad). The membranes were washed thoroughly with buffer. Protein-bound ⁶³Ni was quantified by counting the radioactivity of the filters. Controls were performed as described [12]. Background radioactivity (in the absence of protein) was negligible. In some experiments, the NikR variants were washed with a 250-

fold excess of Na₂EDTA for 20 min before immobilization and washing, as above.

Ni(II) binding kinetics Time-dependence of Ni(II) binding by Q2E NikR was followed at 302 nm, using a Bio-logic SFM400 stopped-flow apparatus equipped with a MOS-450 UV/vis spectrophotometer, in 20 mM Hepes pH 8.0, 0.1 M NaCl, 293 K. NiSO₄ (between 0.2 and 6.4 μ M) was mixed with NikR (between 2 and 64 μ M), in series of experiments with a Ni(II):NikR ratio of 1:10 and 1:20. NiSO₄ was also mixed at a fixed concentration (6 μ M), with NikR between 10 and 105 μ M. NikR was consistently in excess to avoid protein precipitation. The average was taken of at least 5 traces for subsequent analysis.

Acknowledgements

We thank L. Terradot for help with the dynamic light scattering experiments.

References

- [1] De Pina K, Desjardin V, Mandrand-Berthelot MA, Giordano G, Wu LF (1999) *J Bacteriol* 181: 670-674.
- [2] Eitinger T, Mandrand-Berthelot MA (2000) *Arch Microbiol* 173: 1-9.
- [3] Dosanjh NS, Michel SLJ (2006) *Curr Opin Chem Biol* 10: 123-130.
- [4] Schreiter ER, Sintchak MD, Guo Y, Chivers PT, Sauer RT, Drennan, CL (2003) *Nat Struct Biol* 10: 794-799.
- [5] Chivers PT, Sauer RT (1999) *Protein Sci* 8: 2494-2500.
- [6] Chivers PT, Sauer RT (2000) *J Biol Chem* 275: 19735-19741.
- [7] Schreiter ER, Wang SC, Zamble DB, Drennan CL (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13676-13681.
- [8] Carrington PE, Chivers PT, Al-Mjeni F, Sauer RT, Maroney, MJ (2003) *Nat Struct Biol* 10: 126-130.
- [9] Chivers PT, Sauer RT (2002) *Chem Biol* 9: 1141-1148.
- [10] Wang SC, Dias AV, Bloom SL, Zamble DB (2004) *Biochemistry* 43: 10018-10028.
- [11] Bloom SL, Zamble DB (2004) *Biochemistry* 43: 10029-10038.
- [12] Fauquant C, Diederix REM, Rodrigue A, Dian C, Kapp U, Terradot L, Mandrand-Berthelot MA, Michaud-Soret I (2006) *Biochimie* 88: 1693-1705.
- [13] Outten CE, O'Halloran TV (2001) *Science* 292: 2488-2492.
- [14] Watt RK, Ludden PW (1999) *Cell Mol Life Sci* 56: 604-625.
- [15] Ge RG, Watt RM, Sun XS, Tanner JA, He QY, Huang JD, Sun HZ (2006) *Biochem J* 393: 285-293.
- [16] Kim JS, Kang SO, Lee JK (2003) *J Biol Chem* 278: 18455-18463.
- [17] Stola M, Musiani F, Mangani S, Turano P, Safarov N, Zambelli B, Ciurli S (2006) *Biochemistry* 45: 6495-6509.
- [18] Atanassova A, Zamble DB (2005) *J Bacteriol* 187: 4689-4697.
- [19] Blokesch M, Rohrmoser M, Rode S, Bock A (2004) *J Bacteriol* 186: 2603-2611.
- [20] Zambelli B, Bellucci M, Danielli A, Scarlato V, Ciurli S (2007) *Chem Commun* (in press). doi: 10.1039/b706025d
- [21] Abraham LO, Li Y, Zamble DB (2006) *J Inorg Biochem* 100: 1005-1014.
- [22] Kuzmic P (1996) *Anal Biochem* 237: 260-273.
- [23] Johnson KA (1986) *Meth Enzymol* 134: 677-705.
- [24] Halford SE (1975) *Biochem J* 149: 411-422.
- [25] Anderegg G (1999) *Anal Chim Acta* 394: 345-352.
- [26] Smith RM, Martell AE, Motekaitis RJ (2001) *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database v6.0*, National Institute of Standards and Technology.
- [27] See the footnotes to Martell AE, Smith RM (1974) *Critical Stability Constants*. Vol. 1. Plenum Press, New York, pp 269-272.

II.3. L'agrégation métal-dépendante d'EcNikR

II.3.1. Un phénomène réversible

Comme on peut le voir sur la [Figure II.1](#), au-delà de 1 équivalent de nickel ajouté à EcNikR, cette dernière s'agrège. Ce phénomène débute à partir de 0.8 équivalent de nickel ajouté, et est maximal au-delà de 1,5 équivalents de nickel comme on peut le voir sur la [Figure II.2](#) qui montre le suivi de l'agrégation de la protéine.

Cette stoechiométrie suggère que l'agrégation est liée à la liaison au minimum de 2 nickels supplémentaires par tétramère de protéine dont les sites de liaison présenteraient une affinité proche de celle du site de haute affinité.

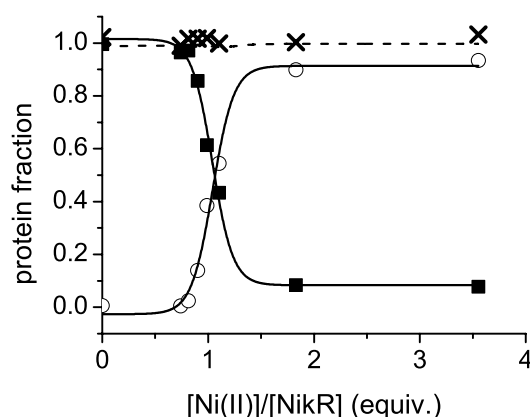


Figure II.2 Précipitation de EcNikR Q2E en fonction du nickel. La fraction soluble de protéine (carré plein) et la fraction précipitée (cercle ouvert) ont été déterminées par spectroscopie d'absorption après centrifugation et dissolution du culot protéique par de l'EDTA (5mM) et du KCN (2.5mM) (1h d'incubation). Les croix représentent la somme des deux fractions correspondant à 80μM de protéine.

Cette agrégation Ni-dépendante est réversible rapidement (quelques secondes) en présence d'agent chélateur tel que l'EDTA. Ce comportement suggère que le nickel responsable de l'agrégation est lié dans des sites exposés au solvant. L'action de l'EDTA sur le nickel du site dit de haute affinité est beaucoup plus lente ($t_{1/2}$: 5h) ce qui est en accord avec la littérature (Chivers & Sauer, 2002), mais peut être accélérée en présence de cyanure de potassium. Ceci indique que le site dit de haute affinité est enfoui et peut être rendu inaccessible à des chélateurs comme l'EDTA.

II.3.2. Un phénomène dépendant de la métallation de sites annexes

Afin de déterminer la quantité maximale de nickel liée par EcNikR Q2E et WT, deux techniques ont été employées.

La première technique a consisté en la détermination de la quantité de nickel liée à la protéine agrégée en dosant le nickel libre en solution après agrégation et élimination du culot protéique. Un dosage colorimétrique avec du PAR a été employé pour doser le Ni(II) libre.

La seconde technique a consisté en la mesure de la quantité de nickel liée à la protéine par FBA. Cette technique est présentée en Matériel et Méthodes.

Les deux techniques employées donnent des résultats concordants. EcNikR peut lier entre 5 à 8 Ni(II) par monomère selon la technique employée (Dosage du Ni(II) libre ou FBA respectivement), cependant la spécificité de liaison de ces différents sites n'est pas connue.

L'ensemble du travail concernant l'agrégation métal dépendante est décrit dans une publication à Biochimie (p – 140 -).

II.4. Effet du pH et du Ni(II) sur la métallation

II.4.1. Résumé

Les propriétés de métallation et d'agrégation d'EcNikR sont Ni- et pH-dépendantes. L'acidification du tampon de métallation a conduit à deux observations :

- Plus de 1 équivalent de Ni(II) doivent être ajoutés à la protéine pour observer une saturation du site dit de haute affinité. L'affinité de ce site pour le Ni(II) est affectée par la protonation de deux classes de résidus (pKa 4.1 (Glu97 ?) et 6.1 (H87, 89 ?)) impliqués soit directement dans la liaison du Ni(II), soit dans le réseau de liaison hydrogène.
- L'agrégation de la protéine est « retardée ». Une addition plus conséquente de Ni(II) doit être faite pour l'observer. Ce « décalage » est de nouveau corrélé à la protonation des résidus responsables de l'agrégation. Le pKa apparent d'agrégation serait de 5.4. Des histidines, dont le pKa est proche de 6, pourraient être responsables de l'agrégation. Ce sont de bons ligands potentiels du nickel (48 histidines par protéine native (tétramère), dont 12 sont impliquées dans la liaison du Ni(II) dans le site de haute affinité).

Une étude comparative a été faite sur la protéine NikR d'*Helicobacter pylori* : HpNikR. Cette dernière lie 1 équivalent de Ni(II) dans son site de haute affinité avant que ne soit observée une phase de saturation.

HpNikR ne présente pas la même susceptibilité à l'agrégation en présence de nickel qu'EcNikR. A pH8, 3 équivalents de Ni(II) sont nécessaires pour observer sa précipitation. Cette différence de sensibilité peut être corrélée à la présence de sites supplémentaires décrits dans la structure de HpNikR (site externe) et absent chez EcNikR et la moins grande richesse en histidines (28 par protéine native dont 20 sont impliquées dans la liaison du Ni(II) du site de haute affinité et du site externe).

Ces différents travaux ont été décrits dans une publication publiée dans le journal Biochimie qui est présentée par la suite (p – 140 -).

Nos résultats nous ont amenés à proposer qu'un cluster d'histidines (H77, H78, H79) exposé au solvant présent à l'embouchure du site de haute affinité chez EcNikR mais absent chez HpNikR soit un site potentiel impliqué dans l'agrégation de la protéine.

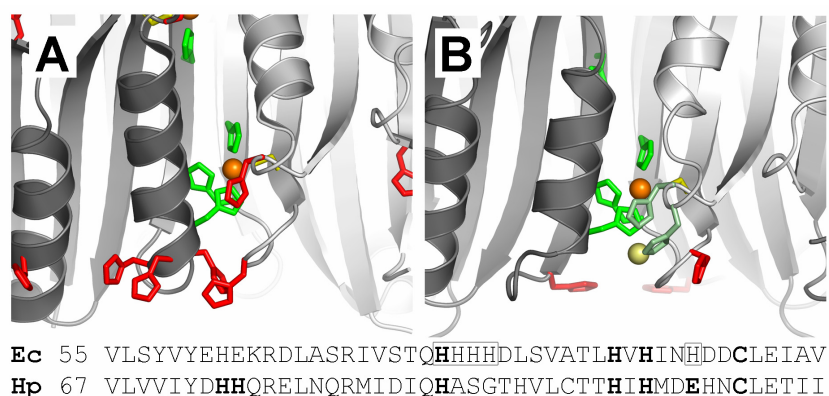


Figure II.3 Comparaison du contenu et de la localisation des histidines entre EcNikR (A) et HpNikR (B). Le Ni(II) du site dit de haute affinité (HA) est en orange et le Ni(II) du site externe est en jaune (chez HpNikR). Les histidines et la cystéine impliquées dans la liaison du Ni(II) du site HA sont en vert et en jaune respectivement. Les histidines impliquées dans la liaison de Ni(II) du site externe sont en vert pâle. Les histidines qui ne sont pas impliquées dans la liaison du Ni(II) sont en rouge. Le cluster d'histidines se situe à l'embouchure du site HA. Une comparaison des séquences entre Ec et HpNikR est montrée, les résidus impliqués dans la liaison du Ni(II) sont en gras. Le cluster d'histidines est encadré (Fauquant *et al.*, 2006).

Afin de vérifier notre hypothèse, une étude des propriétés de métallation d'un triple mutant d'EcNikR ne possédant plus ce cluster a été entreprise et sera présentée en II.5 p- 153 -.

II.4.2. Publication

pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* NikR



pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* NikR

C. Fauquant^{a,1}, R.E.M. Diederix^{a,1,2}, A. Rodrigue^b, C. Dian^c, U. Kapp^c, L. Terradot^c,
M.-A. Mandrand-Berthelot^b, I. Michaud-Soret^{a,*}

^a Laboratoire de Physicochimie Des Métaux en Biologie, Département Réponse et Dynamique et Cellulaires, CEA-Grenoble,
17, avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

^b Unité de Microbiologie et Génétique (UMR 5122 CNRS-UCB-INSA), Université Lyon-I, 10, rue Raphaël-Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, France

^c The European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble cedex 9, France

Received 2 February 2006; accepted 19 July 2006

Available online 14 August 2006

Abstract

NikR proteins are bacterial metallo-regulatory transcription factors that control the expression of the nickel uptake system and/or nickel containing enzymes such as urease, and are involved in the acid stress response. Here, a comparative study is reported on NikR from *Helicobacter pylori* (HpNikR) and *Escherichia coli* (EcNikR), as well as the Q2E mutant of EcNikR. Most attention was focused on the Ni(II) binding properties of these proteins, as a function of pH. The influence of the pH on the Ni(II) binding and aggregation properties was studied using gel filtration analysis and UV–visible absorption spectroscopy in the presence of an increasing concentration of nickel. Q2E and wt EcNikR are identical in Ni(II) binding but the Q2E mutant is impaired to some extent in DNA-binding. For EcNikR it is shown that between pH 6 and 8, addition of Ni(II) above 1 equiv. induces mass aggregation and precipitation, concomitant with binding of Ni(II) up to a maximum of 5–8 Ni(II) ions per monomer. The Ni(II) site with highest affinity is the well-described square planar site with three histidines and one cysteine ligands. Aggregation is complete in the presence of less than 1 extra equiv. of Ni(II) and aggregation is fully reversible and precipitates are rapidly solubilized by addition of EDTA. The sensitivity of EcNikR to aggregation decreases with decreasing pH, concurrent with histidines being the main ligands of the site responsible for aggregation. HpNikR does not display aggregation except at alkaline pH, where 3 Ni(II) equiv. are needed. The participation of a cluster consisting of surface-exposed histidines present in EcNikR but not in HpNikR, is proposed to be involved in aggregation. Our results on HpNikR are compatible with the crystallographic data and with the ability of this protein to bind more than one nickel.

© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: NikR; Nickel; pH; *Helicobacter pylori*; *Escherichia coli*

Abbreviations: BTP, Bis–Tris propane; (1,3-bis[tris(hydroxymethyl) methylamino]propane); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylene diamino tetraacetic acid; HEPES, (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid); IPTG, isopropyl β-D-thiogalactoside; MES, 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid; MOPS, morpholinopropanesulfonic acid; PAR, [4-(2-pyridylazo) resorcinol]; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; Tris, Tris(hydroxymethyl) amino methane; UV/vis, UV–visible.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 38 78 99 40; fax: +33 4 38 78 34 62.

E-mail address: imichaud@cea.fr (I. Michaud-Soret).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Instituto de Química Física “Rocasolano”, CSIC, Madrid, Spain.

0300-9084/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

doi:10.1016/j.biochi.2006.07.016

1. Introduction

NikR is the Ni(II)-responsive transcription regulator that is responsible for maintaining appropriate levels of Ni(II) in *Escherichia coli* and a variety of other Gram-negative bacteria and archaea, including the gastro-intestinal human pathogen *Helicobacter pylori*. This organism relies heavily on Ni(II), as the nickel-dependent enzyme urease is essential for combating the acidic pH of the stomach, through generation of ammonia. Indeed, *H. pylori* mutants devoid of urease are unable to colonize the gastric mucosa in animal models (reviewed in [1]). Urease is regulated by an intricate interplay of different environmental signals including the concentration of urea, metal ions or pH value. The activity of urease depends critically on the availability of nickel ions that are required for the synthesis of a functional urease complex [2]. Nickel bioavailability is dependent on nickel sequesters or transport proteins such as Hpn and NixA, respectively [3,4] whose expression levels are controlled by the HpNikR regulator [5], a homologue of NikR from *E. coli* (EcNikR) [6–8].

HpNikR is a 148 amino-acid (17 kDa) protein which has the capacity to directly regulate multiple genes and can act as both an activator (for the urease gene expression) and repressor in response to nickel. HpNikR can regulate *H. pylori* nickel metabolism by directly controlling transcriptional repression of NixA-mediated nickel uptake and transcriptional induction of urease expression [5,9–11]. HpNikR is a member of the ribbon-helix-helix (RHH) family of transcription factors which displays low sequence similarity with EcNikR (21% identity and 54% homology) [5] and contains less histidines than the EcNikR protein.

EcNikR is involved in nickel homeostasis and represses the expression of the *nikABCDE* operon which codes for a nickel-specific ABC transport system [6,12]. This permease is synthesized under anaerobic conditions to provide nickel ions necessary for hydrogenase activity [7]. EcNikR is able to bind Ni(II) and subsequently binds to an operator sequence preceding the *nikABCDE* operon [7]. EcNikR is a 133 amino-acid (15 kDa) protein, member of the RHH family of transcription factors, which recognizes a 28 bp palindromic operator sequence (GTATGA(N)₁₆TCATAC in *E. coli*), preventing the recruitment of RNA polymerase [6,13,14]. EcNikR is a histidine-rich protein (12 residues per monomer) that is tetrameric in solution, and is known to bind several transition metals in two categories of binding sites [14–16].

The crystal structure of apo-EcNikR displays two separate domains, a C-terminal oligomerization domain and an N-terminal dimeric DNA-binding domain containing the RHH motif [8]. The crystal structure of the truncated C-terminal Ni(II)-bound NikR shows a Ni(II) ion bound at the interface of the C-terminal part of the protein involved in the tetramerization [8]. Per monomer, one Ni(II) is present which is coordinated in a square planar geometry by three histidines and one cysteine [8,14]. Binding to this His₃Cys site is easily detected by UV/vis spectroscopy because of the absorption due to an S→Ni(II) LMCT band observed at 302 nm. Ni(II) is located

at the interface between two monomers, whereby one of the three histidines comes from the adjacent monomer [8]. The Ni(II)-binding site is approximately 30 Å away from the DNA-binding site, suggesting that Ni(II) can activate DNA-binding over a long-distance in EcNikR, which could trigger the necessary structural rearrangement upon DNA-binding, as the DNA-binding regions in EcNikR are too far apart to accommodate both binding sequences on the DNA [8]. In addition to the His₃Cys site, evidence of at least one other nickel binding site has been reported, based on enhanced DNA-binding affinity in excess Ni(II) [15,16]. This second site is UV/vis silent and has a lower affinity for nickel than the His₃Cys site.

The more recently solved apo- and metallated structures of NikRs from *Pyrococcus horikoshii* (PhNikR) [17] and *H. pylori* confirmed the general properties of the NikR protein family [18] and showed strict conservation of the His₃Cys Ni binding site. Interestingly, the DNA-binding domain of PhNikR could adopt several conformations, reflecting its flexibility and possibly illustrating a DNA-binding regulation mechanism modulated by the nickel content [17]. In HpNikR, two additional binding sites were found at the interface resulting in a stable conformation in the crystal with only two His₃Cys sites, two intermediate sites and two external sites per tetramer. Moreover, the residues belonging to the three sites were shown to be necessary for HpNikR response to nickel in vivo, suggesting that in HpNikR, the particular nickel binding organization is an important feature of that protein [18]. This illustrates that despite their homology, NikR proteins from different species possess distinct properties, and that the exact mechanisms by which NikR proteins bind their cognate DNA upon nickel binding are probably different as well.

In this paper we present a characterization of the Ni(II) binding and oligomerization properties of HpNikR, and wt EcNikR and Q2E EcNikR as a function of pH. The Q2E mutant of EcNikR contains a mutation in the β -sheet in the DNA-binding domain involved in recognition of the cognate DNA [13]. We show that this mutation affects DNA-binding but has little effect on the Ni(II)-binding behavior of EcNikR. Both EcNikR and HpNikR bind Ni(II) in the His₃Cys site, the affinity of Ni(II) for this site decreases with decreasing pH. At low pH, NikR from both organisms dissociates into dimers, which is reversed by Ni(II) binding. In addition to the His₃Cys site, additional Ni(II)-binding sites exist, with lower affinities, which in the case of EcNikR results in mass aggregation and precipitation. The aggregated EcNikR protein remains capable of binding Ni(II) with micromolar affinity up to five to eight nickel ions per monomer. Aggregation is rapidly reversed by addition of EDTA and is strongly pH dependent, with an approximate apparent pK_a of 5.4, consistent with the involvement of histidines in Ni(II) binding. A possible new role of EcNikR as a Ni(II)-storage protein beside its repressor role will be discussed. The participation of surface-exposed clusters of histidines in EcNikR is likely, as HpNikR, which does not have these clusters, is much less sensitive to Ni(II)-induced precipitation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Trizma, Bis-Tris propane, MOPS, HEPES and MES buffers, EDTA, NiSO₄ or NiCl₂ were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Cloning and site-directed mutagenesis

E. coli nikR gene, from p8611 [6] was subcloned into the *NcoI* and *HindIII* site of the vector pET28a (Novagen), resulting in pET28NikRQ2E. This construct was used to produce p28ETNikRWT, which contains the gene for wt NikR. The QuikChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagen) was used for mutagenesis, with the following primers (mutated base underlined): primer *nikR1*: 5'-GAAGGAGATATACCATGCAACGAGTCACCATCACGC and primer *nikR2*: 5'-GCGTGATGGTGAAGTCGTTGCATGGTATATCTCCTTC. The resulting plasmid was sequenced by Genome Express (Meylan, France). Cloning of the HpNikR encoding gene (hp1338) into the pET11 expression vector resulting in pILL695 has been previously described in [5].

2.3. Protein over-expression and purification

All the purification procedures were performed at 4 °C using Amersham Biosciences columns and centrifugations were run at 6 °C. All protein concentrations are expressed in monomer units. B834(DE3) or BL21(DE3) star competent cells were freshly transformed with the recombinant plasmids.

Overnight cultures of *E. coli* BL21(DE3) with pET28-NikRQ2E were diluted 100-fold in 3 l flasks containing 1 l LB medium supplemented with kanamycin (50 µg ml⁻¹) and grown at 37 °C. At OD₆₀₀ = 0.6, the cells were induced with 0.5 mM IPTG for 3 h. The cells were harvested by centrifugation, resuspended in 10 ml (per 500 ml of culture) of sonication buffer (20 mM Tris/HCl pH 8, 0.3 M NaCl, 10% glycerol and lysed by sonication. The lysate was centrifuged at 20,000 × *g* for 20 min. The supernatant was loaded on a nickel loaded-chelating column (iminodiacetic acid in Sepharose 6B Fast flow, Sigma). The column was washed with 8 volumes of buffer A (20 mM Tris/HCl pH 8, 0.3 M NaCl), followed by 3, 3 and 4 column volumes of buffer A containing 25, 50 and 75 mM imidazole (pH 8), respectively. The protein was eluted with 2 volumes of buffer A plus 250 mM imidazole. EDTA was added to 20 mM to the eluted solution to prevent protein aggregation and the protein was dialyzed overnight at 4 °C against buffer B (20 mM Tris/HCl pH 8, 0.3 M NaCl, 5% glycerol, 2 mM EDTA and 2 mM β-mercapto-ethanol). Buffer exchange and sample concentration were performed with Ultrafree (15 ml, 5 kDa cut-off, Millipore). The concentrated sample was injected on gel filtration column (Superdex 75 prep grade HR16/60) in order to obtain a pure protein (as confirmed by SDS PAGE). Protein concentration was measured using

UV/vis spectroscopy at 278 nm using the theoretical absorption coefficient of 5000 M⁻¹ cm⁻¹.

Because this protocol does not apply to the purification of wt EcNikR, a different protocol was used: *E. coli* BL21(DE3) cells containing pET28NikRWT were grown as described above. The cells were harvested at 6000 × *g* for 10 min and the pellet was suspended in 40 ml 20 mM Tris/HCl pH 8 containing 50 mM EDTA. The cells were disrupted by sonication in ice and centrifuged at 15,000 × *g* for 20 min. The supernatant was dialyzed twice against 3 l of 20 mM Tris/HCl pH 8. A DNase treatment was performed by addition of 4 µl DNase I (Sigma) at 6.4 µg µl⁻¹ and 70 µl 500 mM MgSO₄ and incubation for 15 min at 37 °C. The crude protein mixture was loaded on a MonoQ column (HR10/10) equilibrated with 20 mM Tris/HCl pH 8 and eluted with a linear gradient ranging from 0 to 1 M NaCl. Homogeneous NikR samples were obtained after elution and the purity verified by SDS-PAGE and gel filtration analysis on Superdex 75 prep grade (HR16/60). Pure protein fractions were concentrated with Ultrafree (15 ml, 5 kDa cut-off). Protein concentration was determined by UV/vis spectroscopy at 278 nm and the theoretical absorption coefficient of 5000 M⁻¹ cm⁻¹. The yield was 30 mg of pure protein per liter of bacterial culture. Before use, Q2E and wt EcNikR were exchanged to EDTA- and β-mercapto-ethanol-free buffer by ultracentrifugation.

Recombinant native HpNikR protein was purified from 1 l of LB medium containing ampicillin (50 mg ml⁻¹) inoculated with BL21 star cells harboring pILL695. Expression was induced at OD₆₀₀ = 0.6 with 1 mM IPTG for 3 h at 37 °C. The harvested cells were re-suspended in 20 ml of lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH 8 containing 100 mM EDTA and one tablet of mini "complete" EDTA-free protease inhibitor (Roche) and lysed by sonication (6 × 15 s) on ice. The soluble lysate obtained by centrifugation for 20 min at 20,000 × *g* was dialyzed twice for 2.5 h against 2 l of 20 mM Tris/HCl pH 8 containing one tablet of mini "complete" EDTA-free protease inhibitor (Roche). A DNase treatment was performed by addition of 4 µl DNase I at 6.4 µg µl⁻¹ and 10 mM MgSO₄, and incubation on ice for 1 h. The solution was loaded onto a 5 ml HiTrapQ column equilibrated with 20 mM Tris/HCl pH 8 at 3 ml min⁻¹. The proteins were eluted by a 50 ml linear gradient of 0–0.5 M NaCl (buffered with 20 mM Tris/HCl pH 8), followed by a plateau at 0.5 M NaCl for 20 ml, and a second linear gradient between 0.5 and 1 M NaCl (30 ml). The fractions containing NikR (as verified by SDS PAGE) were pooled and dialyzed overnight against 2 l of 20 mM Tris/HCl pH 8, containing 5 mM β-mercapto-ethanol and one tablet of mini "complete" EDTA-free protease inhibitor. The protein was loaded on a second HiTrapQ column and eluted as described above. The protein was dialyzed overnight against 2 l of 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl, 5 mM β-mercapto-ethanol. After concentration by ultrafiltration (10 kDa cut-off, Amicon), the protein was further purified on a gel filtration column (Superdex 200) equilibrated with 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl. The yield of purification was 50 mg l⁻¹. Protein concentration was measured using UV/vis spectroscopy at

280 nm using the theoretical absorption coefficient of $9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

The presence of residual nickel or other transition metals in thus purified NikR proteins was determined as follows. To EcNikR (500 μM) and HpNikR (290 μM), trichloroacetic acid (TCA) was added to a final concentration of 10%. The protein was allowed to precipitate, for 30 min on ice, after which the precipitate was spun down (10 min, $13,000 \times \text{rpm}$). The supernatant was neutralized with 2 M NaOH and buffered with 1 M Tris-HCl (pH 7.5 at 20°C) to a final concentration of 0.5 M. The concentration of Ni(II) or other transition metals in the solution was determined colorimetrically using 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) [19]. The solutions obtained as above were diluted five times in buffer containing 100 μM freshly prepared PAR and incubated for exactly 1 hour. The change in the UV/vis spectrum of PAR due to binding of Ni(II) or other transition metals was followed, and compared to calibration curves recorded the same day with different transition metals. No evidence for Ni(II) or any other transition metal was detected in EcNikR (Q2E and wild type) and less than 5% of transition metal was detected in HpNikR. Pre-incubation of EcNikR solutions with varying known amounts of NiSO_4 yielded quantitative results with this method, excluding e.g. that the TCA precipitation is not effective in liberating the metal from the protein.

2.4. Analysis of oligomeric forms by zonal and frontal gel exclusion chromatography

Analytical gel filtration chromatography (exclusion chromatography) experiments were performed using a Superdex 75 HR 10/30 gel filtration column (Amersham Biosciences), coupled to an Äkta purifier chromatography system (Amersham Biosciences). Flow rates used were 1.0 ml min^{-1} and the experiments were performed at room temperature. The column was calibrated using the LMW gel filtration calibration kit (Amersham Biosciences) which contains the following weight markers: ribonuclease A (13.7 kDa), chymotrypsinogen A (25 kDa), ovalbumin (43 kDa), bovine serum albumin (67 kDa) and blue dextran 2000 (2 MDa). The stock NikR solutions (kept frozen at -80°C) were incubated for at least 1 h before use, as otherwise heterogeneous elution profiles were recorded. For zonal exclusion chromatography, 100 μl of wt or Q2E EcNikR or HpNikR in 20 mM HEPES pH 8, 1 M NaCl, or 50 mM sodium acetate (pH ranging from 6 to 4.5), 1 M NaCl, were loaded on the column (equilibrated in the studied buffer). Frontal exclusion chromatography [20,21] was performed with apo Q2E EcNikR varying in concentration from 0.2 to 100 μM and with a sample volume of 9 ml. Buffer conditions are as mentioned in the text. The elution profile was monitored at 278 nm, and also at 302 nm when Ni(II) was present. Midpoints of the advancing and trailing fronts of the elution plateau were defined as the maximum and minimum, respectively, of the first-order derivative of the elution profile. Broadening of the trailing front and a shift in the advancing front as a function of protein concentration were interpreted

as evidence of dissociation of NikR oligomers [20,21]. This shift in the elution volume as a function of NikR concentration was fit (non-linear least-squares) assuming an equilibrium between tetrameric (a dimer of dimers) and dimeric NikR, and expressed as [21]:

$$V_e = \frac{\left(\frac{-1 + \sqrt{1 + 16K_{eq}[\text{NikR}]_{\text{total}}}}{4K_{eq}} \right) \times (V_{\text{dimer}} - V_{\text{tetramer}}) + ([\text{NikR}]_{\text{total}} \times V_{\text{tetramer}})}{[\text{NikR}]_{\text{total}}}$$

with $[\text{NikR}]_{\text{total}}$ expressed in weight concentration, V_{dimer} and V_{tetramer} are the elution volumes of dimeric and tetrameric NikR, respectively, and V_e is the elution volume of a mix thereof.

2.5. Nuclease protection assay

NikR binding to the *nikA* promoter was assayed by protection of a single engineered *PstI* site in the *nikA* operator DNA from digestion. To obtain the DNA construct we amplified by PCR a region ranging from -127 to +27 related to the ATG start codon of *nikA*. This fragment was cloned into the *HindIII* and *HincII* sites of vector pUC18. A *PstI* restriction site was introduced in the *NikR* operator site by changing the central region TATGAATTTTA into TATGACGTCTA. Mutations in this region had previously been shown to have no effect on the binding of NikR [14]. The resulting plasmid, pP342, is thus 2820bp long and contains a unique *PstI* site located in between the two EcNikR binding half sites. Digestion by *ScaI* or *HinfI*, of which there are one and five restriction sites, respectively, on the plasmid, was used to estimate non-specific DNA-binding.

The 20 μl reaction mixture contained 20 μM EcNikR, 200 ng (6 nM final concentration) of plasmid pP342 in a buffer consisting of 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 5% glycerol and varying concentrations of NiCl_2 . The reaction was incubated for 25 min at 20°C before addition of one unit of *PstI*, and/or *ScaI* or *HinfI*. The reaction was left for an additional 1 h at room temperature, and mixed with 2 μl of sample loading solution (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol and 30% glycerol). Immediately afterwards, the samples were loaded on a 0.8% agarose gel containing ethidium bromide and the electrophoresis was run at 40 V for 90 min. The intensity of the bands was quantified using Image Master Total Lab (Amersham Biosciences).

2.6. Nickel binding followed by UV/vis spectroscopy

UV/vis spectra were acquired using a Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer, thermostated at 293 K. Ni(II) binding experiments were performed in a 150 μl quartz cuvette (1 cm pathlength) using 200 μl protein solution at 40–200 μM and adding small volumes of NiSO_4 . Spectra were recorded every 40 min. Samples were prepared by diluting concentrated protein solutions 10 times in the appropriate buffer and incubated overnight at 4°C . The buffer used was

20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl, except when studying the pH dependence of binding, in which case 50 mM sodium acetate (pH ranging from 6 to 4.5) 1 M NaCl was used.

2.7. Nickel-dependent precipitation

2.7.1. Quantification of Q2E EcNikR protein precipitation

Q2E EcNikR precipitation as a function of Ni(II) concentration was determined as follows. Q2E EcNikR (80 μ M, 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl) was incubated for 2 h with 0–1000 μ M NiSO₄. The samples were then centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min. Na₂EDTA and KCN were added to the supernatant to final concentrations of 5 and 2.5 mM, respectively, and buffer containing 5 mM Na₂EDTA and 2.5 mM KCN was added to the pellet. The samples were incubated for 1 h, and the protein concentration of the supernatant and now dissolved pellets was verified by determining the absorbance at 280 nm and subtracting the absorbance of buffer/EDTA/KCN alone.

2.7.2. Stoichiometry of nickel binding to precipitated Q2E EcNikR

The amount of nickel bound to Q2E EcNikR as a function of nickel concentration was determined under conditions where the protein is fully precipitated (i.e. above 1.5 equiv. NiSO₄). Q2E EcNikR samples (80 μ M Q2E EcNikR 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl) were incubated for 2 h with 0–1000 μ M NiSO₄, and subsequently centrifuged, as above. The supernatant (containing negligible amounts of protein) was diluted between 10 and 50 times in buffer containing 100 μ M freshly prepared PAR and incubated for exactly 1 hour. The change in the UV/vis spectrum of PAR due to Ni(II) binding was then monitored at 480 nm. The concentration of Ni(II) in the supernatant was determined by comparing the absorbance with a calibration curve recorded the same day. The increase in absorbance at 480 nm of PAR depends linearly on nickel concentration up to 10 μ M [19]. The concentration of Ni(II) in the supernatant thus determined, subtracted from the total concentration

of Ni(II) initially added to the sample was used as a measure of Ni(II) bound to the precipitated Q2E EcNikR.

The stoichiometry of Ni(II) binding to EcNikR was also determined independently, using a filter binding assay [22,23]. ⁶³NiCl₂ (396 nCi nmol⁻¹) was purchased from Amersham Life Science. Sample volumes of 300 μ l containing 4.5 μ M wt or Q2E EcNikR were incubated with increasing concentrations of ⁶³Ni(II) in 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl) for 45 min at room temperature. Aliquots (50 μ l—three deposits) were filtered through buffer-equilibrated Sequiblot PVDF membranes (0.2 μ m—Biorad) in a Bio-Dot[®] Microfiltration apparatus (Biorad). In each well, the membrane was washed eight times with Ni(II)-free buffer. Total ⁶³Ni(II) was determined by counting two 50 μ l samples of the reaction mixtures with PCS scintillation cocktail (Amersham Biosciences), thus correlating measured radioactivity with [Ni(II)] in the sample. The amount of ⁶³Ni(II) bound to the protein was determined by counting filters (square cut around each well) with OCS scintillation cocktail (Amersham Biosciences). Non-specific binding of ⁶³Ni(II) to the membrane (in the absence of protein) was also measured. This amount to $2 (\pm 1.3) \%$ of the total Ni(II), and can thus be neglected. An identical procedure as above was followed to determine the residual Ni(II) bound to Q2E EcNikR remaining after a 20 min incubation of the Ni(II)/NikR solutions with excess EDTA.

3. Results

3.1. Gel filtration analysis at different pH values

Using classical, zonal gel exclusion chromatography, apparent molecular weights of Q2E and wt EcNikRs, and HpNikR were estimated to be 49.4, 46.9 and 58.4 kDa based on their respective elution volumes at 9.56, 9.7 and 9.1 ml at pH 8 (Fig. 1, and data not shown for Q2E EcNikR). These molecular weights are lower than the theoretical molecular weight for the putative tetramers (60 and 69 kDa for EcNikR and HpNikR). This is most likely due to the fact that NikR proteins are not

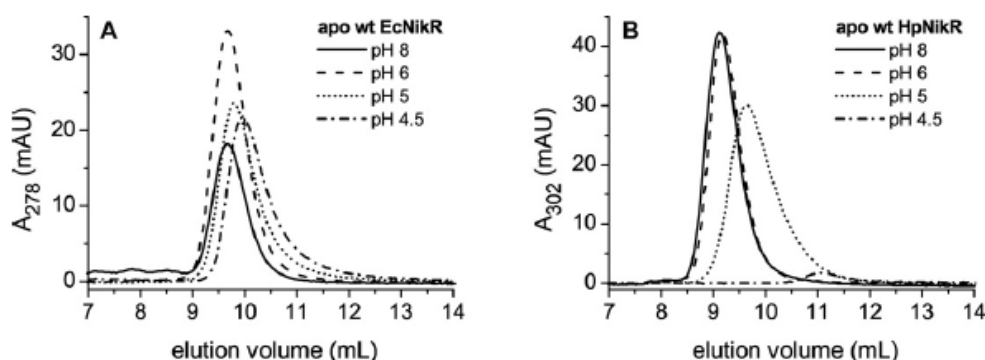


Fig. 1. Gel exclusion chromatography chromatograms of EcNikR and HpNikR. Wt EcNikR (60 μ M) and HpNikR (40 μ M) were loaded on a Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) equilibrated with 20 mM HEPES pH 8, 1 M NaCl (solid line), or with 50 mM sodium acetate pH 6 (dashed line) pH 5 (dotted line) pH 4.5 (dash dotted line), 1 M NaCl, respectively. The solutions were allowed to equilibrate 1 h at room temperature before injection. At pH 8, wt EcNikR, Q2E EcNikR (not shown) and HpNikR are eluted at 9.7, 9.6 and 9.1 ml, respectively. At pH 4.5, wt EcNikR, Q2E EcNikR and HpNikR are eluted at 10, 9.8 and 11.1 ml, respectively.

strictly spherical, but are fairly oblong-shaped [8,18]. This may result in a relatively slower passage through the gel material and consequently lead to underestimation of the molecular weight. It should be noted that NikR proteins have the tendency to form heterogeneous oligomer mixtures when frozen, and need to be incubated at least 1 h at room temperature before further experimentation. These data are in accordance with previous reports for EcNikR [8,15] and very recently for HpNikR [9,18]. Our data clearly show the absence of an effect of the pH on the apparent molecular weight at micromolar concentrations of protein in the range of pH from 6 to 8 (although there is a slight effect on elution volume). However, at lower pH such as 4.5, HpNikR elutes at 11.1 ml, corresponding to a molecular weight of 30.5 kDa, which in principle is compatible with a dimeric protein (theoretical weight 34 kDa). It is possible however that the peak observed at pH 4.5 corresponds to acid-unfolded protein and indeed, at this pH, a large part of the sample is lost because of precipitation. This also is observed when HpNikR at neutral is exchanged for buffer at pH 4.5 by dialysis. However, this is much less the case when Ni(II)-complexed HpNikR, prepared under neutral buffer conditions is exchanged against pH 4.5 buffer. This suggests that Ni(II) binding stabilizes the protein against unfolding, which is comparable to the increase in thermal and chemical stability of EcNikR when Ni(II) is bound to the protein, as previously described by Wang et al. [24].

In contrast to HpNikR, Q2E and wt EcNikRs are perfectly stable at this acidic pH (provided that the buffer contains 1 M NaCl). When 1 equiv. of Ni(II) is added to the protein sample, NikR elutes with a clear absorbance at 302 nm, indicating that Ni(II) is incorporated in the His₃Cys site. This is observed at pH 8 and 6, but not at pH 4.5 for EcNikR. This is fully compatible with UV/vis data (vide infra) and indicates that EcNikR has diminished affinity for Ni(II) at pH 4.5. Much more clearly than in the case of HpNikR, EcNikR appears to dissociate into dimers at low pH. This was probed by frontal exclusion chromatography, which was used to quantify the self-association behavior of Q2E EcNikR. In this technique [20,21], a large sample volume (in our case 9 ml) is applied to the analytical gel filtration column. The elution occurs as a plateau, of which the inflection points of the advancing and trailing fronts correspond to the elution volume of the protein and the elution volume plus the sample volume, respectively. In case of a rapid self-association equilibrium, the symmetry between advancing and trailing fronts is lost, and the inflection point of the advancing front is a function of elution volumes of the self-associating oligomers and their respective concentrations in the sample. In contrast to the more commonly used zonal exclusion chromatography, the sample concentration is not diluted upon passage through the column, allowing control of the protein concentration and permitting injection of very low protein concentrations on the column. In 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl, there was neither change in shape of the elution profile nor in elution volume, using Q2E EcNikR concentrations between 100 and 0.2 μ M. This indicates that no dissociation occurs above 0.2 μ M Q2E EcNikR. Identical results were

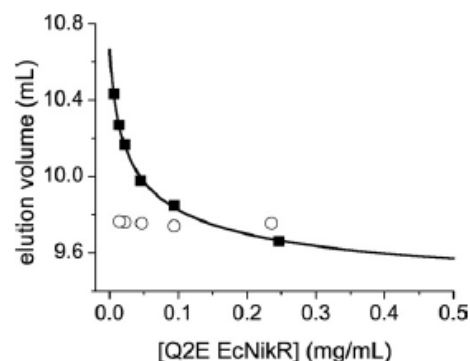


Fig. 2. Elution volume of Q2E EcNikR as a function of protein concentration. The volumes of Q2E NikR in the absence (solid squares) and in the presence of 1 mM NiSO₄ (open circles) were determined using frontal exclusion chromatography, and the data were fit (solid line) as discussed in Section 2. Buffer conditions: 50 mM sodium acetate pH 5, 1 M NaCl.

observed at 1 M NaCl and in 50 mM MES pH 6, 1 M NaCl. However, in 50 mM sodium acetate pH 5, 1 M NaCl, the shape of advancing and trailing fronts of the elution plateau are different, and the inflection point of the advancing front is distinctly shifted to lower elution volumes at lower Q2E EcNikR concentrations (Fig. 2, filled squares). The Q2E EcNikR oligomer thus clearly displays a rapid dissociation equilibrium at this pH and ionic strength. The data could be well fit assuming equilibrium between dimeric and tetrameric Q2E EcNikR (Fig. 2, solid line), yielding a value for the association constant of dimerization of dimers $K_{\text{ass}} = 50.8 (\pm 1.4) \text{ ml mg}^{-1}$. Expressed in molar tetrameric EcNikR, this translates to a value of 0.33 μ M for the corresponding dissociation constant. The concentration dependence of the elution volume together with the evidence for a rapid equilibrium argues against protein unfolding as the cause of the shift in elution volume, although it cannot be ruled out that the protein dimers are partially unfolded. Interestingly, in the presence of 1 mM NiSO₄, no evidence of dissociation was apparent, at least not down to 0.2 μ M Q2E EcNikR (Fig. 2, open circles). At this concentration, Ni(II) is bound to the protein, and thus stabilizes the tetrameric state considerably. We should note the slight difference in elution volume under these conditions for tetrameric apo- and holo Q2E EcNikR, corresponding to apparent molecular weights of 60 and 52 kDa, respectively. This may indicate a change of conformation upon binding of Ni(II) (Fig. 2) resulting in a highly stabilized local conformation of EcNikR as suggested by previous studies [25].

3.2. Nuclease assay on Q2E EcNikR and wt EcNikR shows a difference in protection

The DNA-binding capacity of wt and Q2E EcNikR was assayed using a nuclease protection assay like the one described in the case of protection of the Fur box by the Fur regulator [26]. The capacity to protect from digestion the unique *Pst*I site that we introduced in the N16 sequence between the NikR dyad boxes [14] on the *nikA* operator region

(see Section 2) was assayed as a function of the Ni(II) concentration. In the presence of 20 μM protein and twofold excess of nickel, all the DNA was protected from digestion by wt EcNikR (Fig. 3) in agreement with previous studies using DNaseI protection or band shift assays [15]. In contrast, only partial protection by the Q2E mutant was visible from 10 Ni

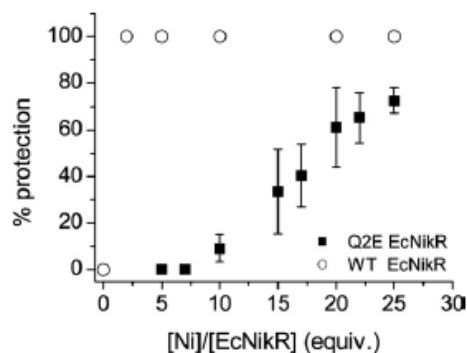


Fig. 3. Percentage of protection against nuclease action by wt (open circles) and Q2E EcNikR (solid squares), respectively. The protection assay was performed using plasmid pP342 which bears a unique *Pst*I restriction site between the two NikR operator half sites of the *nikA* regulatory region. When NikR interacts with its target DNA the *Pst*I site is protected from digestion. Q2E and wt EcNikR were incubated in the presence of DNA and increasing [Ni(II)]. After nuclease action and migration on agarose gels, band quantification allows to estimate the % of protection due to NikR binding to the DNA (see Section 2).

(II) equiv. and it reached a maximal level of 70% when an excess of more than 25 equiv. of Ni(II)/NikR was added. This is in line with expectations, as the Q2E mutation lies in the RHH fold of the N-terminal domain mediating DNA recognition [13]. In the absence of added nickel, no protection by the wild type protein or by the Q2E mutant was observed (data not shown). The presence of aspecific binding was also estimated using a second nuclease (*Sca*I or *Hin*I) to digest the plasmid used in our assay in sites which do not contain similarity with the *nik* box. In presence of excess Ni(II), aspecific binding was consistently observed, albeit to a lesser degree than the specific binding (not shown). The amount of aspecific binding followed roughly the amount of specific binding, meaning that it was stronger for wt EcNikR than Q2E EcNikR. Also, it was not observed in absence of nickel for both proteins. In vivo transcriptional activities in the presence of increasing amount of nickel displayed differential patterns between the wt and Q2E EcNikR proteins corroborating these in vitro DNA protection assays (AR, MAMB unpublished observations).

3.3. Nickel binding to NikR followed by UV/vis spectroscopy

Addition of up to 1 equiv. of Ni(II) to wt EcNikR results in a UV/vis spectrum with bands at 243, 262, 302, 370(sh), 460 and ~570 nm (Fig. 4A, B), in agreement with previous report

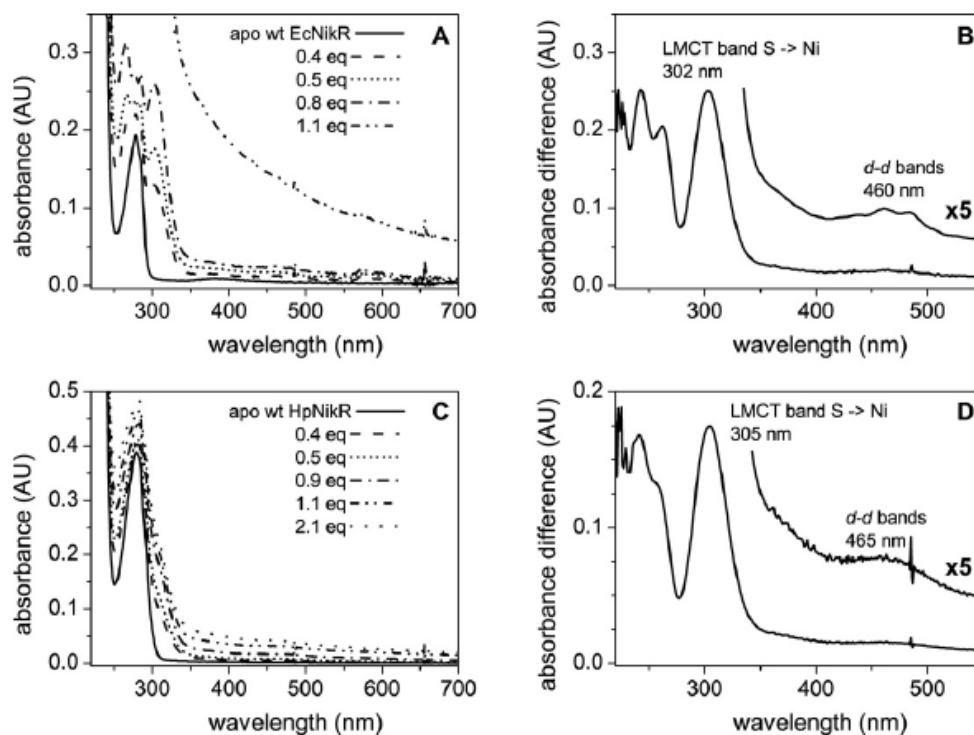


Fig. 4. A: UV/vis spectra of circa 40 μM wt EcNikR in the absence (solid line) and in the presence of increasing concentrations of NiSO_4 (0.4 equiv. (dashed line), 0.5 (dotted line), 0.8 (dash dotted line) and 1.1 equiv. (dash dot dot line), respectively). B: Difference spectrum between wt EcNikR loaded with 32 μM NiSO_4 (0.8 molar equiv.) and apo-wt EcNikR. C: UV/vis spectra of circa 40 μM wt HpNikR in the absence (solid line) and in the presence of increasing concentrations of NiSO_4 (0.4 equiv. (dashed line), 0.5 (dotted line), 0.9 (dash dotted line), 1.1 equiv. (dash dot dot line) and 2.1 equiv. (short dashed line), respectively). D: Difference spectrum between HpNikR loaded with 36 μM NiSO_4 (0.9 molar equiv.) and apo-HpNikR. Buffer conditions: 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl at 293 K.

[14] and consistent with Ni(II) binding in the His₃Cys site. The lower energy bands at 460 and 560 nm are assigned to square planar Ni(II) *d-d* transitions [27,28], while the intensity and position of the bands at 370, 302, 262 and 243 nm suggest they are ligand to metal charge transfer bands, namely Cys S^γ→Ni(II) [27,28]. This agrees with previous EXAFS and X-ray crystallographic studies, where Cys95 was assigned as a ligand to the nickel, and where the site was assigned a square planar geometry [8,29]. A similar spectrum is obtained for the Ni(II)-Q2E EcNikR complex (data not shown) and for the Ni(II)-HpNikR complex (Fig. 4C, D).

Interestingly, in our hands, addition of more than 1 equiv. of Ni(II) to Q2E and wt EcNikR consistently leads to mass aggregation and precipitation, apparent in the form of scattering in the UV/vis spectrum (Fig. 4A). This aggregation has been investigated in more detail and will be discussed further below.

3.4. pH dependence of Ni(II) binding and aggregation of NikR proteins

Binding of Ni(II) to the His₃Cys site and Ni(II)-dependent aggregation site were studied as a function of pH for all three NikR variants by monitoring the absorbance at 302 nm (Fig. 5). The initial increase in absorbance up to 1 equiv. Ni

(II) per monomer corresponds to Ni(II) binding in the His₃Cys site. A second increase in absorbance upon increasing [Ni(II)] is due to light scattering and is related to the appearance of protein aggregates. These aggregates are clearly visible to the eye and tend to stay dispersed in the solution, providing a rough relation between intensity of the light scattering and degree of aggregation (*vide infra*).

Lowering the pH has three noticeable effects on Ni(II) uptake by EcNikR (Fig. 5B). i) The linear increase in absorbance at 302 nm due to Ni(II) binding in the His₃Cys site becomes less steep. This may be due to a decrease in the extinction coefficient of the site, but it is more likely that the site is only partially filled by Ni(II) due to a lowering of the affinity of the site for Ni(II) at lower pH. Also, saturation of the His₃Cys site with Ni(II) requires more than 1 equiv. Ni(II) at lower pH. If we consider that the extinction coefficient is independent of pH, then the linear dependence of the absorption on [Ni(II)] (provided that [NikR] >> [Ni(II)]) is indicative of the binding constant. This 'apparent extinction coefficient' is plotted in Fig. 5D for Q2E EcNikR and HpNikR as a function of pH. The data concerning the Q2E EcNikR were fit to the Henderson–Hasselbalch equation for a single protonation (Fig. 5D, solid line), yielding a fairly poor fit ($pK_a = 5.2$). The fit was considerably improved assuming the minimal involvement of two protonating ligands (Fig. 5D, dashed line)

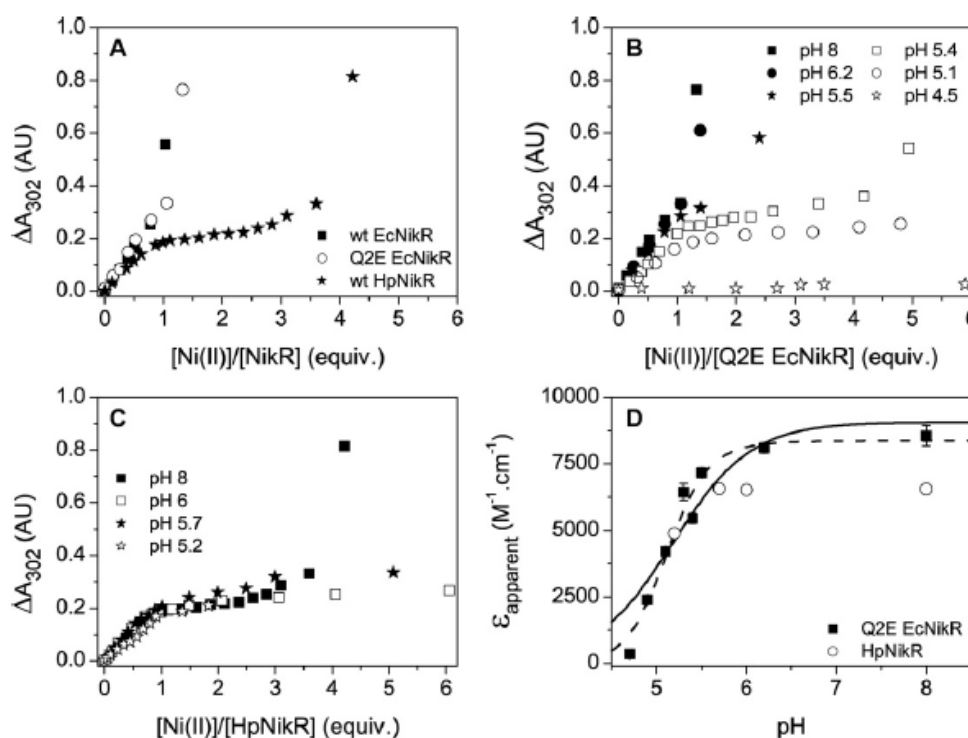


Fig. 5. Ni(II) binding by EcNikR and HpNikR followed by UV/vis spectroscopy at 302 nm. A: Ni(II) titrations performed in 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl. B: Ni(II) titrations performed on Q2E EcNikR in 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl, and 50 mM sodium acetate with 1 M NaCl, at the pH value indicated, respectively. C: Ni(II) titrations of HpNikR, as in plane B. D: pH dependence of the apparent extinction coefficient of Q2E EcNikR (filled squares) HpNikR (open circles), respectively. The apparent extinction coefficients were determined as the linear increase in absorbance as a function of [Ni(II)], between 0 and 0.3 equiv. Ni(II), divided by the protein concentration. The Q2E EcNikR data were non-linear squares fit assuming a single pK_a (solid line) or with two independent pK_a 's (dashed line), and assuming that the fully protonated species has an extinction coefficient with zero value.

yielding pK_a values of 4.1 and 6.1, respectively. ii) The formation of aggregates requires more Ni(II) at lower pH. This may be in line with a decreased affinity of the site(s) responsible for aggregation with decreasing pH. The apparent pK_a of the aggregation is roughly 5.4, as judged from Fig. 5B, which is in line with the involvement of histidine residues in aggregation. iii) The increase in absorbance due to light scattering becomes less steep at lower pH, indicating that aggregation apparently becomes less cooperative. This can be explained by considering that aggregation requires Ni(II) binding to an as yet unidentified site. A diminished affinity of this site for Ni(II) at lower pH then lowers the amount of 'aggregation-prone' protein, which consequently is reflected in a less steep dependence of aggregation on [Ni(II)]. Aggregation, which immediately follows saturation of the His₃Cys site at pH 8, becomes a clearly separate process at pH 5.1 (Fig. 5B), indicating that aggregation is a cooperative process involving NikR with Ni(II) bound in a site different than the His₃Cys site. At pH 4.5 the affinity of Q2E EcNikR for Ni(II) is very low, both for the His₃Cys site as for the second site.

As can be seen in Fig. 5A, at pH 8 Q2E EcNikR and wt EcNikR display similar behavior in terms of binding of Ni(II) to the His₃Cys site as well as in terms of light scattering, whereas HpNikR behaves slightly differently. The pH dependence of HpNikR is in essence the same as of Q2E EcNikR (Fig. 5C), meaning that with decreasing pH, aggregation requires higher [Ni(II)]. However, the 'apparent extinction coefficient' appears to be lower than the one for Q2E EcNikR and appears to decrease with decreasing pH (although there are only data points down to pH 5.2, Fig. 5D). It is relevant to note that this may be compatible with the recent structural study which indicated that only two of the four His₃Cys sites are occupied, and additional Ni(II) ions are bound to other, spectroscopically silent, sites [18]. It is interesting that aggregation requires a more than doubled amount of Ni(II) compared to EcNikR, which could point to the presence of one or more additional sites as those described in HpNikR crystal structure [18] that are not present in EcNikR. Moreover, whereas EcNikR starts to aggregate at 1 equiv. Ni(II) at pH 8–6, this decrease in pH has a much larger effect on HpNikR aggregation: at pH 8, 3 equiv. of Ni(II) are required and at pH 6 no aggregation is seen up to 20 equiv. of Ni(II) (Fig. 5C). This suggests that HpNikR will not aggregate in presence of high concentrations of nickel within the cell.

3.5. EcNikR aggregation is reversible and requires sub-stoichiometric Ni(II)

As discussed above, wt and Q2E EcNikR are highly sensitive to the concentration of Ni(II), and readily form aggregates or precipitates. This is manifested by light scattering in the UV/vis spectrum, starting at close to 1 equiv. Ni(II) for both proteins. The aggregates does not have a great tendency to settle, and tend to stay dispersed rather long. Once centrifuged, the precipitate may be easily being dispersed once more. This indicates that the nature of the aggregates is very different from

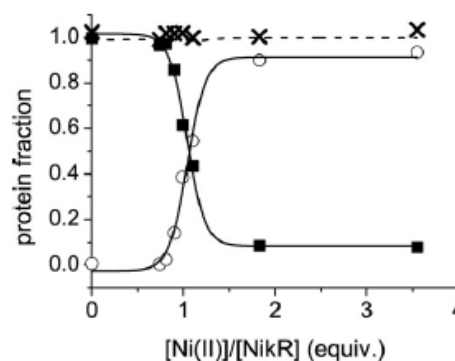


Fig. 6. A) Precipitation of Q2E EcNikR as a function of NiSO₄ in 20 mM HEPES pH 8, 0.1 M NaCl. The fraction of protein present in soluble form (solid squares) and as precipitate (open circles) was determined by absorption spectroscopy after separation by centrifugation and dissolution of the protein pellets using metal EDTA and KCN. Crosses indicate the sum of both fractions, corresponding to 80 μ M protein. The solid lines are for illustrative purposes only.

those formed by denatured protein for example. Interestingly, the addition of Ni(II) scavenging agents such as EDTA leads to immediate dissolution of the precipitate. In Fig. 6 the Ni(II)-dependent precipitation of Q2E EcNikR is quantified. Aggregation starts to become apparent in the presence of circa 0.8 equiv. Ni(II) and is complete at 1.5 equiv. Ni(II), whereas half of the protein is aggregated at 1.1 equiv. Ni(II). Aggregation is thus likely to be due to binding of on average probably between one to two Ni(II) ions per tetramer with a K_d not far above that of the His₃Cys site. Addition of EDTA dissolves the precipitate within seconds but does not affect the presence or characteristics of Ni(II) in the His₃Cys site, making it unlikely that Ni(II) is transferred from the His₃Cys site to a different site as a result of aggregation. The fast action of EDTA on the aggregate indicates that the Ni(II) ion(s) responsible for aggregation are bound to a highly exposed site, as well as that the aggregate is probably permeable for molecules such as EDTA. Interestingly, the Ni(II) in the His₃Cys site is only very slowly released to EDTA ($t_{1/2}$ = 5 h), but this is considerably accelerated in the presence of small amounts of potassium cyanide (RD, IMS, unpublished observations). This indicates that the His₃Cys site is in a relatively buried environment, i.e. accessible to CN⁻, but not to EDTA, in accordance with the crystal structure of wt EcNikR [8].

We determined the amount of Ni(II) bound to Q2E EcNikR and wt EcNikR by two different methods (Fig. 7A, B). In Fig. 7A the amount of Ni(II) bound to Q2E EcNikR was determined by quantifying the amount of Ni(II) remaining in solution after removal of the aggregate. In Fig. 7B the total amount of Ni(II) bound to EcNikR as a function of Ni(II) concentration was determined using a filter binding assay [22,23]. The amount of Ni(II) that can bind to the protein varies between the different experiments with between 5 and 8 Ni(II) ions per NikR monomer. It is presently unclear how many of these sites are due to a specific binding of Ni(II). Note however that the filter binding experiment was performed at relatively low protein concentration (4.5 μ M), making it unlikely that the

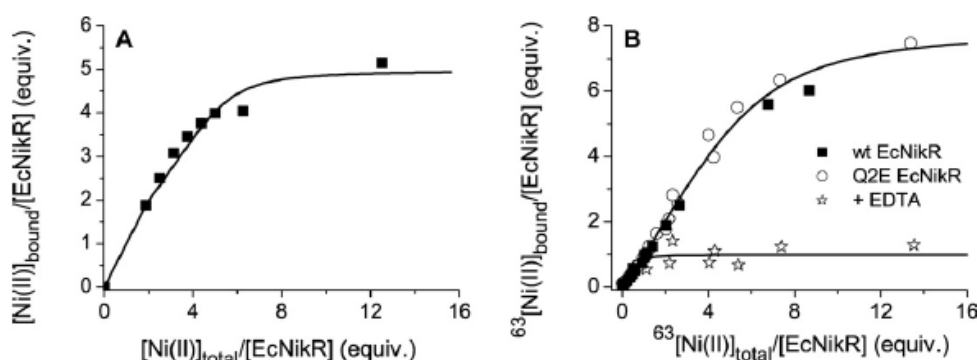


Fig. 7. A) Amount of bound Ni(II) per NikR monomer as a function of $NiSO_4$. Binding of Ni(II) was estimated indirectly by determining the concentration of unbound Ni(II) using a colorimetric assay. The data were simulated (solid line) using a model assuming sequential binding of five Ni(II) ions, with K_d values for each step increasing from roughly 0.2 to 50 μM , using the Dynafit fitting program [39]. Conditions: 20 mM HEPES pH 8.0, 0.1 M NaCl, $[NikR] = 80 \mu M$, $T = 298 K$. B) Amount of $^{63}Ni(II)$ equivalents bound per EcNikR monomer as a function of added $^{63}Ni(II)$. Binding of $^{63}Ni(II)$ was measured by a filter binding assay. In one case, residual Ni(II) bound to Q2E EcNikR was determined after a pre-incubation with excess EDTA. Conditions: 20 mM HEPES pH 8.0, 0.1 M NaCl at 298 K [wt EcNikR] = 4.5 μM (filled squares), [Q2E EcNikR] = 4.3 μM (open circles) and [Q2E EcNikR] = 4.2 μM plus EDTA (open stars). The solid lines represent a fit of the combined data of wt and Q2E EcNikR to a model of sequential binding of eight Ni(II) ions, yielding K_d values of each binding step increasing from roughly 0.2 to 12 μM , and a fit of the EDTA-washed data, respectively. In the latter case, data were fit assuming binding of a single Ni(II) ion, yielding a K_d value of circa 0.2 μM . Fitting was performed using Dynafit [39]. Note that no physical meaning can be extracted from mentioned K_d values, due to the high protein concentration, and the fits are meant to illustrate the stoichiometry of Ni(II) binding only.

affinity of a number of these sites is much higher than micromolar. It is clear that EcNikR has a remarkable propensity for Ni(II) binding, and that in aggregated form it may bind between 20 and 30 Ni(II) ions per tetramer.

4. Discussion

Under neutral and alkaline conditions, HpNikR and Q2E EcNikR and wt EcNikRs are tetrameric in solution, in accordance with previous reports (EcNikR [15] and very recently for HpNikR [9]). At lower pH values, dissociation into dimers is observed, with an estimated dissociation constant of 0.3 μM for Q2E EcNikR at pH 5. Binding of Ni(II) to the His₃Cys site of Q2E EcNikR (and HpNikR) stabilizes the tetrameric state significantly. The tetramer is made up of two pairs of dimers. Each dimer is stabilized through extensive hydrophobic contacts through the intertwine of their N-terminal domain and hydrophobic contacts between the β sheets in the C-terminal domain [8]. In turn, the pairs of dimers are connected through significantly less extensive hydrophobic contacts as well as a hydrogen-bonding network at the interface containing the His₃Cys sites and an abundance of other histidine residues. It is thus suggested that the tetramer dissociates into the described dimers at low pH, through an as yet unknown mechanism. It is interesting to observe the effect of Ni(II) on the quaternary state of NikR, in relation to the fact that the tetrameric protein is required to bind its cognate DNA, but it is unlikely that the observed dissociation into dimers also occurs under in vivo conditions, knowing that the intracellular NikR concentration has been estimated to 200 nM in aerobically growing *E. coli* cells [15].

When Ni(II) is added to EcNikR or HpNikR, Ni(II) is bound to the well-described square planar His₃Cys site with its typical UV/vis absorption spectrum [9,15,24]. This is thus

the site with the highest affinity in NikR, estimated to have a K_d of around 15 pM in earlier reports [9,15,24]. The affinity of this site is strongly pH dependent however, and at low pH (pH 4.5) we show that Ni(II) binding is very poor. The pH dependence of the affinity of the EcNikR His₃Cys site for Ni(II) is best fit by assuming two protonation events, with apparent pK_a values of 6.1 and 4.1, respectively. These are protonating side-chains involved in the Ni(II) binding or in indirect stabilization of the Ni(II) binding sites. The best candidates for such a pK_a are the Ni(II) ligands and close by residues such as those involved in the H-bond network described by Schreiter et al. [8]. This H-bond network links the four Ni(II) sites in the tetramer and involves links between H87(subunitA)-E97(A)-Y58(A)-(and Y60(A))-Q75(A)-H89 (subunitB). We can assume that the pH dependence of the affinity of the His₃Cys site is similar in HpNikR, although we have been able to study this only down to pH 5.2.

In the case of Q2E and wt NikR, addition of Ni(II) above 1 equiv. leads to mass aggregation. At pH 8, aggregation is complete before the addition of 1.5 Ni(II) equiv., indicating that aggregation is caused by the binding of less than two Ni(II) ions per NikR tetramer in addition to the Ni(II) bound to the His₃Cys sites. The EcNikR aggregate remains capable of binding a significant number of additional Ni(II) ions, with micromolar affinity. It thus appears that in addition to its His₃Cys site, EcNikR contains between four and seven additional sites of reasonably high affinity. This is corroborated by an earlier study, where a total of up to five unique sites could be identified by soaking EcNikR crystals with excess Ni(II) [30]. As mentioned, mass aggregation requires on average two Ni(II) binding per tetramer, in a site with the second-highest affinity after the His₃Cys site. The crystal structure of EcNikR indicates that there are two clusters of histidine residues protruding from either site of the interface of the dimer

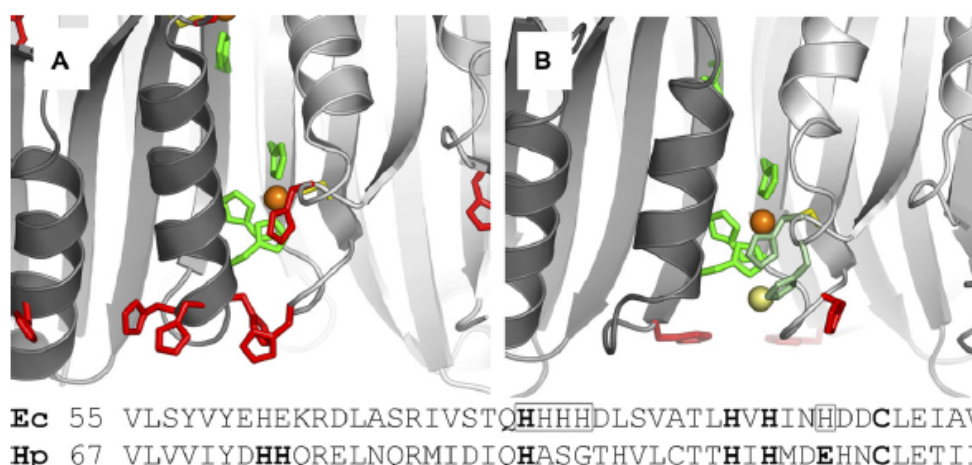


Fig. 8. Comparison of the histidine content between EcNikR and HpNikR structures. Ribbon diagrams of the EcNikR (Panel A) and HpNikR (Panel B) structures in a view perpendicular to the twofold crystallographic axis of HpNikR [18]. Subunits are colored in dark gray (chains A and D for EcNikR; chains A and C for HpNikR) and white (chains B and C for EcNikR; chains B and D for HpNikR). Ni(II) ions of the His₃Cys site (both EcNikR and HpNikR) are represented by orange spheres and the Ni(II) ion from the HpNikR external site by a yellow sphere. Side-chains of histidines and other residues involved in Ni(II) binding are in wireframe representation. Histidine and cysteine side-chains involved in the His₃Cys site are colored in green and yellow, respectively. Histidine side-chains involved in the HpNikR external site are colored in pale green. Histidines that do not participate in Ni(II) binding either in EcNikR or HpNikR are colored in red. The structural alignment was generated by superimposing the C-terminal domain of HpNikR (PDB code 2CAD) on EcNikR (PDB code 1Q5Y) (r.m.s. deviation in C α positions is 2.51 Å) [40]. The figures were prepared using the program PyMol [41]. Below, a sequence comparison of EcNikR and HpNikR is shown. The residues thought to be involved in the histidine cluster (as discussed in the text) are boxed, and the residues involved in the external Ni(II) binding site in HpNikR are underlined [18].

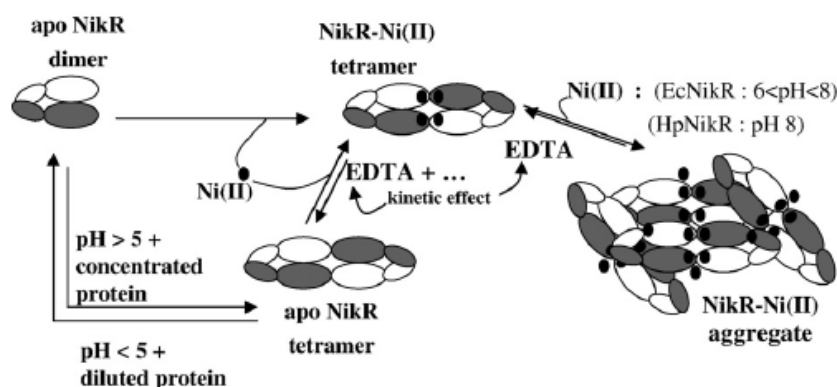
pairs (see Fig. 8). It is expected that these clusters have a fair affinity for Ni(II) and they could be the two binding sites involved in aggregation. The involvement of histidine side-chains in this site is further corroborated by the pH dependence of aggregation. This is roughly judged to have an apparent pK_a of around 5.4, based on the tendency to aggregate. Finally, this cluster is not present, or contains much less surface-exposed histidine side-chains, in HpNikR (Fig. 8), a protein that is much less sensitive to Ni(II)-induced mass aggregation. Aggregation in HpNikR starts at around 3 equiv. Ni(II) at pH 8, but is hardly observable at lower pH (pH 6) (see Fig. 5C). It is thus plausible that in EcNikR, the cluster of histidines 77–79 is directly involved in the Ni(II) binding leading to aggregation (Fig. 8). In addition, histidine 92, which is present in EcNikR but not in HpNikR, and is highly solvent-exposed, is a good candidate to participate in this site. Interestingly, a site with these exact characteristics was indeed found in crystals of EcNikR soaked in excess Ni(II) [30]. In HpNikR, the non-conserved histidine 93, located at the surface of the tetramer interface is prone to bind nickel and could be involved in aggregation (data not shown).

As mentioned, at pH 8, where one would expect that all potential Ni(II) ligands are deprotonated, aggregation in HpNikR does not take place until 3 equiv. Ni(II) are present. HpNikR was shown to possess two additional Ni(II) sites at the interface of NikR dimers, called sites I (intermediate) and X (external) [18]. It would appear that one or more of these sites are filled in solution as well, and that occupation of these sites does not cause mass aggregation. In the Ni(II)-solution soaked crystals it was observed that only two out of four His₃Cys sites were occupied with Ni(II), with two additional Ni(II) ions bound to two of the four I sites and two addi-

tional Ni(II) bound to two of the four X sites (i.e. 6 Ni(II) ions per HpNikR tetramer). In solution, the distribution is either the same in the presence of 1.5 equiv. of Ni(II) or the His₃Cys site is saturated with Ni(II) before binding to another sites occurs. Nevertheless, it is clear that each monomer binds on average two Ni(II) ions, until the binding of a third Ni(II) is leads to aggregation. At lower pH 5–6, which is probably the working range of the pH in the *H. pylori* cytoplasm in acidic stress conditions, HpNikR does not aggregate.

The presence of a functional Ni(II) binding site in EcNikR additional to the His₃Cys site has been reported previously in [14,15,24]. Whereas Ni(II) binding to the His₃Cys site activates the protein for DNA-binding [15], the presence of excess Ni(II), where presumably the second site has Ni(II) bound, leads to a marked increase in DNA-binding affinity as well as an increased footprint size on the operator DNA [15]. This suggests that the second site, which in our hands consistently leads to mass aggregation, may be equivalent to the site found to be responsible for enhanced DNA-binding [14,15,24].

It is presently not fully resolved what is the mechanism of aggregation is for EcNikR, but EcNikR and HpNikR clearly respond differently to nickel binding. Ni(II)-induced aggregation may be the result of a conformational change following Ni(II) binding, enhancing inter-tetramer affinity and thus facilitating formation of a matrix of NikR tetramers. Alternatively, tetramer–tetramer interactions may be facilitated through binding of two adjacent tetramers in the aggregate to the same Ni(II) ion. The fact that aggregation can be reversed completely and rapidly may indicate that large conformational changes involving exposure of significant hydrophobic surface do not occur, as this would be expected to yield a certain amount of misfolded protein. The aggregates remain dispersed in solution



Scheme 1. Schematic summary of the pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *E. coli* and *H. pylori* NikR.

for an appreciable amount of time, suggesting that the density of the aggregates is not much different from water. As the average density of proteins is substantially higher than water, i.e. around 1.4 g ml⁻¹ [31], this may indicate a high water content of the aggregate, and possibly room for small molecules to diffuse within the aggregate, facilitating Ni(II) uptake and release.

Scheme 1 shortly summarizes the features of NikR described above. The Ni(II)-dependent aggregation and precipitation behavior seen with EcNikR has been mentioned in previous studies [14,15,24], but has never been described to be such a dominant property of EcNikR. Although transition metal-dependent precipitation is not an uncommon feature of proteins in general, this usually tends to take place at metal concentrations far above the micromolar concentrations used in our studies. In fact, reversible ligand-dependent mass aggregation is to our knowledge a rare phenomenon, described in only a few cases (vide infra). Since the affinity of most Ni(II)-binding proteins in the cytoplasm is around the micromolar range [23,32–35], it may be argued that this is the relevant concentration in vivo, although such data were derived from in vitro experiments. This may indicate that in the cellular environment, EcNikR is also prone to mass aggregation. Clearly further research will be needed to clarify if NikR aggregation occurs in vivo. Two interesting properties pertain to the NikR aggregates. First, the aggregates remain capable of binding a significant amount of additional Ni(II) ions. Secondly, the aggregation can be rapidly reversed upon addition of Ni(II) scavengers, presumably following release of the bound Ni(II) ions (interestingly, the Ni(II) bound in the His₃Cys site requires a small ligand such as cyanide to be released within a physiologically relevant time-scale). These are properties expected to be required for a protein involved in the storage of Ni(II). A role of NikR in surplus Ni(II) storage has been suggested previously in [16]. It is an interesting notion that EcNikR would be involved in Ni(II) homeostasis, both at the level of gene expression and at the level where the response is more direct. The advantages to the cell are obvious, as a storage system consisting of NikR aggregates is capable of immediate release of Ni(II), perhaps increasingly so under conditions of enhanced acidity, when required (i.e. when the free

[Ni(II)] falls below a threshold concentration), and also capable of absorbing excess (and thus toxic [36]) Ni(II) rapidly. The two proteins described to date expressing metal-dependent, reversible mass aggregation, are *P. horikoshii* CutA, and the histidine-rich protein Hpn from *H. pylori*. The former was shown to display this behavior with Cu(II) and is thought to be involved in transition metal storage and detoxification [37], whereas the latter binds Ni(II) and was attributed an identical function [38]. No homologue exists for Hpn in *E. coli*. We found that HpNikR is much less sensitive to metal-dependent aggregation than EcNikR, which may be related to the fact that in vivo such behavior is not required as it is performed by Hpn in *H. pylori*. It would be interesting in future work to assess the DNA-binding activity of purified HpNikR as a function of its Ni(II)-loaded state as well as a function of pH.

Acknowledgments

We are indebted to Julien Viret and Christelle Caux-Thang for their help in the experimental work.

References

- [1] K. Stingl, H. De Reuse, Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity?, *Int. J. Med. Microbiol.* 295 (2005) 307–315.
- [2] P.R. Hawtin, H.T. Delves, D.G. Newell, The demonstration of nickel in the urease of *Helicobacter pylori* by atomic absorption spectroscopy, *FEMS Microbiol. Lett.* 61 (1991) 51–54.
- [3] H.L. Mobley, R.M. Garner, G.R. Chippendale, J.V. Gilbert, A.V. Kane, A.G. Plaut, Role of Hpn and NixA of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to bismuth and other metal ions, *Helicobacter* 4 (1999) 162–169.
- [4] J.V. Gilbert, J. Ramakrishna, F.W. Sunderman Jr., A. Wright, A.G. Plaut, Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*, *Infect. Immun.* 63 (1995) 2682–2688.
- [5] M. Contreras, J.M. Thiberge, M.A. Mandrand-Berthelot, A. Labigne, Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*, *Mol. Microbiol.* 49 (2003) 947–963.
- [6] K. De Pina, V. Desjardin, M.A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano, L.F. Wu, Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-

- responsive regulator in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 181 (1999) 670–674.
- [7] T. Eittinger, M.A. Mandrand-Berthelot, Nickel transport systems in microorganisms, Arch. Microbiol. 173 (2000) 1–9.
 - [8] E.R. Schreiter, M.D. Sintchak, Y. Guo, P.T. Chivers, R.T. Sauer, C.L. Drenman, Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR, Nat. Struct. Biol. 10 (2003) 794–799.
 - [9] L.O. Abraham, Y. Li, D.B. Zamble, The metal- and DNA-binding activities of *Helicobacter pylori* NikR, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1005–1024.
 - [10] I. Delany, R. Ieva, A. Sonagni, M. Hilleringmann, R. Rappuoli, V. Scarlato, In vitro analysis of protein–operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*, J. Bacteriol. 187 (2005) 7703–7715.
 - [11] F.D. Ernst, E.J. Kuipers, A. Heijens, R. Sarwari, J. Stoof, C.W. Penn, J.G. Kusters, A.H. van Vliet, The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*, Infect. Immun. 73 (2005) 7252–7258.
 - [12] C. Navarro, L.F. Wu, M.A. Mandrand-Berthelot, The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel, Mol. Microbiol. 9 (1993) 1181–1191.
 - [13] P.T. Chivers, R.T. Sauer, NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, Protein Sci. 8 (1999) 2494–2500.
 - [14] P.T. Chivers, R.T. Sauer, Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni²⁺-dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites, J. Biol. Chem. 275 (2000) 19735–19741.
 - [15] P.T. Chivers, R.T. Sauer, NikR repressor: high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA, Chem. Biol. 9 (2002) 1141–1148.
 - [16] S.L. Bloom, D.B. Zamble, Metal-selective DNA-binding response of *Escherichia coli* NikR, Biochemistry 43 (2004) 10029–10038.
 - [17] P.T. Chivers, T.H. Tahirou, Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition, J. Mol. Biol. 348 (2005) 597–607.
 - [18] C. Dian, K. Schauer, U. Kapp, S.M. McSweeney, A. Labigne, L. Terradot, Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in apo and nickel-bound states, J. Mol. Biol. 361 (2006) 715–730.
 - [19] K.A. McCall, C.A. Fierke, Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals, Anal. Biochem. 284 (2000) 307–315.
 - [20] D.J. Winzor, The development of chromatography for the characterization of protein interactions: a personal perspective, Biochem. Soc. Trans. 31 (2003) 1010–1014.
 - [21] D.J. Winzor, Analytical exclusion chromatography, J. Biochem. Biophys. Methods 56 (2003) 15–52.
 - [22] Z. Wang, M.P. Schmitt, R.K. Holmes, Characterization of mutations that inactivate the diphtheria toxin repressor gene (dtxR), Infect. Immun. 62 (1994) 1600–1608.
 - [23] M. Blokesch, M. Rohrmoser, S. Rode, A. Bock, HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation, J. Bacteriol. 186 (2004) 2603–2611.
 - [24] S.C. Wang, A.V. Dias, S.L. Bloom, D.B. Zamble, Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR, Biochemistry 43 (2004) 10018–10028.
 - [25] A.V. Dias, D.B. Zamble, Protease digestion analysis of *Escherichia coli* NikR: evidence for conformational stabilization with Ni(II), J. Biol. Inorg. Chem. 10 (2005) 605–612.
 - [26] B. D'Autreaux, D. Touati, B. Bersch, J.M. Latour, I. Michaud-Soret, Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 16619–16624.
 - [27] H. Kozłowski, B.D.-L. Reverend, D. Fichoux, C. Loucheux, I. Sovago, Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. Potentiometric and spectroscopic studies, J. Inorg. Biochem. 29 (1987) 187–197.
 - [28] E. Pereira, L. Gomes, B. de Castro, Synthesis, spectroscopic and electrochemical study of nickel-(II) and -(I) complexes with Schiff-base ligands giving a NN'OS co-ordination sphere, Journal of the Chemical Society Dalton Transaction 4 (1998) 629–636.
 - [29] P.E. Carrington, P.T. Chivers, F. Al-Mjeni, R.T. Sauer, M.J. Maroney, Nickel coordination is regulated by the DNA-bound state of NikR, Nat. Struct. Biol. 10 (2003) 126–130.
 - [30] E.C. Schreiter, Crystallographic studies of the metal-responsive transcription factor NikR, Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 2005, pp. 88–112.
 - [31] H. Fischer, I. Polikarpov, A.F. Craievich, Average protein density is a molecular-weight-dependent function, Protein Sci. 13 (2004) 2825–2828.
 - [32] A. Atanassova, D.B. Zamble, *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel, J. Bacteriol. 187 (2005) 4689–4697.
 - [33] N. Mehta, J.W. Olson, R.J. Maier, Characterization of *Helicobacter pylori* nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase, J. Bacteriol. 185 (2003) 726–734.
 - [34] S.B. Mulrooney, S.K. Ward, R.P. Hausinger, Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease, J. Bacteriol. 187 (2005) 3581–3585.
 - [35] S. Benoit, R.J. Maier, Dependence of *Helicobacter pylori* urease activity on the nickel-sequestering ability of the UreE accessory protein, J. Bacteriol. 185 (2003) 4787–4795.
 - [36] H. Babich, G. Stotzky, Toxicity of nickel to microbes: environmental aspects, Adv. Appl. Microbiol. 29 (1983) 195–265.
 - [37] Y. Tanaka, K. Tsumoto, T. Nakanishi, Y. Yasutake, N. Sakai, M. Yao, I. Tanaka, I. Kumagai, Structural implications for heavy metal-induced reversible assembly and aggregation of a protein: the case of *Pyrococcus horikoshii* CutA, FEBS Lett. 556 (2004) 167–174.
 - [38] R. Ge, R.M. Watt, X. Sun, J.A. Tanner, Q.Y. He, J.D. Huang, H. Sun, Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*, Biochem. J. 393 (2006) 285–293.
 - [39] P. Kuzmic, Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, Anal. Biochem. 237 (1996) 260–273.
 - [40] L. Potterton, S. McNicholas, E. Krissinel, J. Gruber, K. Cowtan, P. Emsley, G.N. Murshudov, S. Cohen, A. Perrakis, M. Noble, Developments in the CCP4 molecular-graphics project, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60 (2004) 2288–2294.
 - [41] W.L. DeLano, 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, <http://www.pymol.org>. DeLano Scientific, CA, USA.

II.5. Le mutant EcNikR 3HA

II.5.1. Obtention de la protéine

La construction du gène codant pour la protéine EcNikR 3HA dont les résidus His 77, 78 et 79 ont été mutés en alanine, est décrite en Matériel et Méthodes. Sa séquence a été vérifiée et la séquence protéique déduite est la suivante (Figure II.4):

```

1  MQRVTITLDD DLLETLDLSL QRRGYNNRSE AIRDILRSAL AQEATQQHGT  50
51  QGFAVLSYVY EHEKRDLASR IVSTQHAAAD LSVATLHVHI NHDDCLEIAV  100
101 LKGDMDGVQH FADDVIAQRG VRHGLQCLP KED 133

```

Figure II.4 Séquence de la protéine EcNikR 3HA, les 3 histidines (H77, 78 et 79) ont été mutées en alanine (soulignées). Les ligands du site de haute affinité sont en gras (H76, H87, H89 et C95).

Cette construction ayant été réalisée, la protéine a pu être produite et purifiée.

EcNikR 3HA a été obtenue à partir d'une souche BL21(DE3) d'*E.coli* surproductrice et a été purifiée selon le protocole mis au point lors de ma thèse et décrit dans la publication (Fauquant *et al.*, 2006) auquel quelques modifications ont été apportées et sont décrites dans le Matériel et Méthodes.

L'obtention de la protéine a lieu en 2 temps, ces différentes étapes sont présentées sur la Figure II.5 :

La première étape consiste en la surproduction de la protéine à l'aide d'un système inductible à l'IPTG (étape 1).

La seconde étape consiste en la purification de la protéine. Cette dernière a lieu en deux temps. Dans un premier temps la protéine est pré-purifiée sur une colonne échangeuse d'anions (étape 2A) après que l'extrait protéique ait été dessalé et traité à la DNaseI.

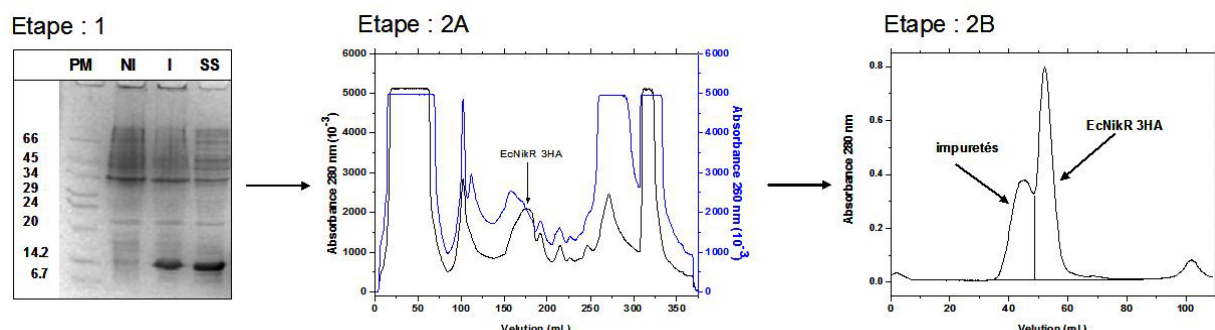


Figure II.5 Obtention de la protéine EcNikR 3HA. Etape 1 : Gel SDS-PAGE montrant la surproduction de la protéine dans des cellules B21(DE3) (NI : non induit ; I : induction pendant 3h avec de l'IPTG ; SS : extrait protéique après cassage des cellules). Etape 2 : Purification A) Pré-purification de la protéine sur une colonne Resource Q après dessalage et traitement à la DNaseI des extraits protéiques. B) Injection de la protéine EcNikR 3HA pré-purifiée sur une colonne d'exclusion moléculaire.

Dans un second temps la protéine est injectée sur une colonne d'exclusion moléculaire afin d'éliminer les dernières impuretés (étape 2B).

La protéine est éluée à un volume de 52 mL qui est proche de celui de EcNikR WT (53 mL). L'état oligomérique de EcNikR 3HA est de la même nature que celui de EcNikR WT, c'est un tétramère ([Figure II.6A](#)) ([Fauquant *et al.*, 2006](#)). La mutation du cluster d'histidines n'affecte pas l'état d'oligomérisation de la protéine.

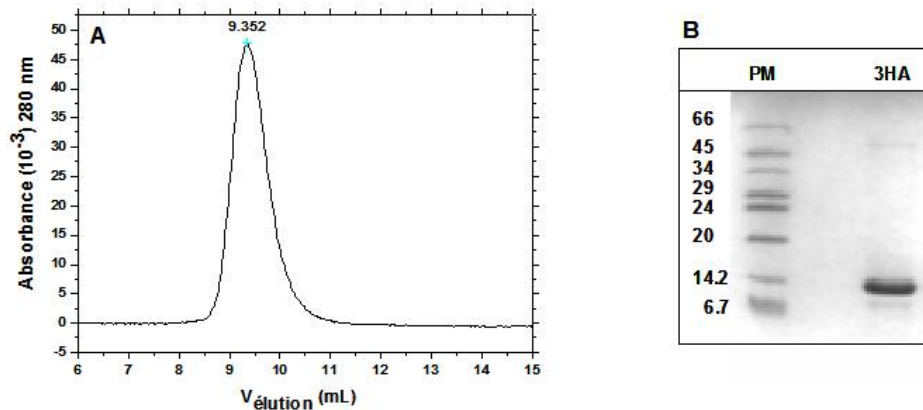


Figure II.6 EcNikR 3HA purifiée. A) Profil EcNikR 3HA obtenu après élution sur une colonne d'exclusion moléculaire, dans du 20mM Tris/HCl pH7.4, 400mM NaCl. B) Gel SDS-PAGE d'EcNikR HA purifiée.

L'analyse par SDS-PAGE montre que la protéine EcNikR 3HA est pure et présente un poids moléculaire apparent de 14 kDa ([Figure II.6B](#)). Le poids moléculaire théorique est de 14894 Da.

Afin de s'assurer de la masse exacte de la protéine en conditions dénaturantes, un échantillon a été analysé par spectrométrie de masse (ESI-TOF). L'analyse, faite par D. Lascoux du LSMP de l'IBS Grenoble, a révélé que le poids moléculaire était de 14895 Da. La protéine purifiée correspond au mutant attendu. Ce dernier a ensuite été caractérisé.

II.5.2. Caractéristique de la protéine purifiée

II.5.2.1. Contenu métallique

Le contenu métallique du mutant après purification a été déterminé par un dosage colorimétrique avec du 4-(2-pyridylazo)résorcinol (PAR) dont la technique est décrite dans le Matériel et Méthodes.

La mesure du contenu métallique a été faite à deux reprises sur un échantillon de 166μM de protéine ayant subi au préalable une dénaturation par le TCA afin de rendre accessible le métal au PAR. Le dosage ainsi réalisé est comparé à une courbe de calibration mesurée le jour

même avec le nickel complexé au PAR (Figure II.7). EcNikR 3HA en sortie de purification contenait moins de 2% de métal.

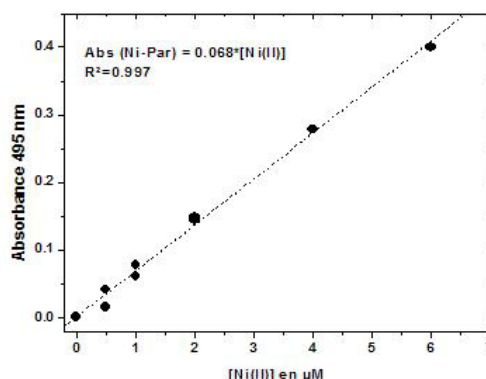


Figure II.7 Gamme étalon du complexe PAR-Ni(II) en fonction du nickel ajouté. Tampon : 1M Tris/HCl pH 7.4 à 20°C.

II.5.2.2. Structuration du mutant EcNikR 3HA

II.5.2.2.1. Les informations structurales apportées par le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) correspond à l'absorption différentielle de la composante circulaire droite et gauche de la lumière par des chromophores qui possèdent une chiralité intrinsèque ou qui sont placés dans un environnement chiral (Kelly & Price, 2000; Kelly *et al.*, 2005).

Dans l'UV lointain (180-250 nm), le dichroïsme circulaire pour des protéines rend compte de leur structure secondaire. En effet les liaisons peptidiques absorbent majoritairement dans cette gamme de longueur d'onde.

Les spectres CD des différentes structures secondaires sont présentés dans la Figure II.8 :

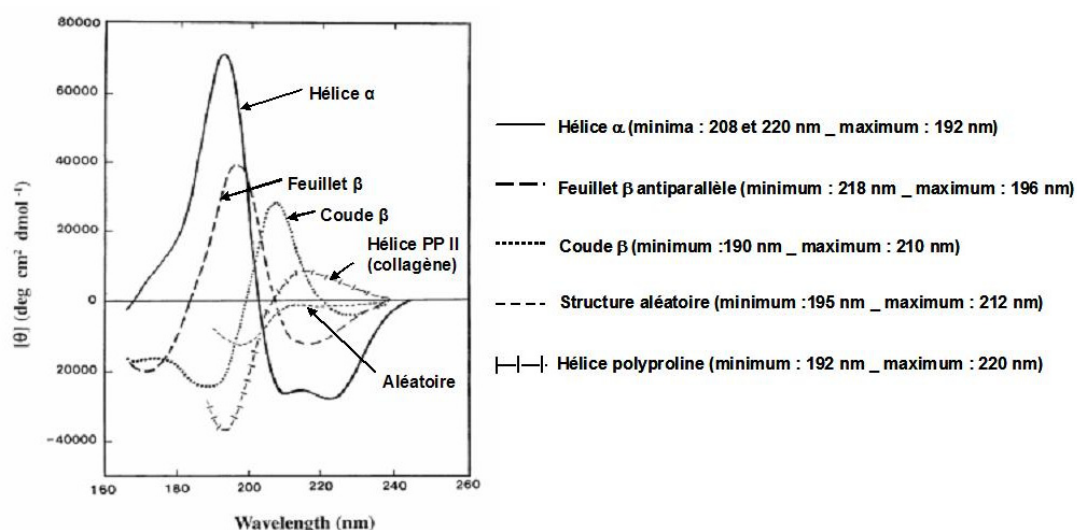


Figure II.8 : Spectres CD dans l'UV-lointain des différentes structures secondaires (Kelly & Price, 2000; Kelly *et al.*, 2005).

Dans l'UV-proche (250-320 nm), le dichroïsme circulaire rend compte de la présence ou non d'une structure tertiaire de la protéine. Ce sont essentiellement les chaînes latérales des résidus aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) qui absorbent dans cette région. Chacun de ces résidus a une signature caractéristique :

- Le tryptophane a un pic proche de 290 nm
- La tyrosine présente un pic compris entre 275 nm et 282 nm
- La phénylalanine présente des maxima d'absorbance compris entre 255 et 270 nm.

Le spectre CD des résidus aromatiques peut être influencé par de nombreux facteurs parmi lesquels le nombre de résidus aromatiques, leur environnement, la rigidité de la molécule et des interactions entre ces résidus plus particulièrement si la distance les séparant est inférieure à 1 nm.

Dans certains cas, les protéines présentant des ponts disulfures peuvent avoir une signature dans l'UV-proche se caractérisant par une bande large centrée sur 260 nm.

Des chromophores non protéiques comme par exemple la flavine peuvent également donner un signal en CD qui dépend de l'environnement de ce chromophore.

Afin de nous assurer de la structuration du mutant, des mesures en CD dans l'UV-lointain (200 - 250 nm) et dans l'UV-proche (250 – 320nm) ont été enregistrées en absence et en présence de nickel et comparées à celles faites sur la protéine WT.

II.5.2.2.2. La structure secondaire de EcNikR 3HA

Le spectre CD du mutant EcNikR 3HA apo ne présente aucun minimum ou maximum caractéristique d'une structure secondaire particulière à la différence du spectre d'EcNikR WT. Cela suggère que la structure secondaire d'EcNikR 3HA est un mixte d'hélice α et de feuillet β (Figure II.9A) et est légèrement différente de celle d'EcNikR WT.

L'addition de nickel à la protéine modifie l'intensité de l'ellipticité molaire d'EcNikR 3HA (Figure II.9A) ce qui se traduit par un maximum à 240 nm et un minimum à environ 216 nm observable sur le spectre de différence (Figure II.9B).

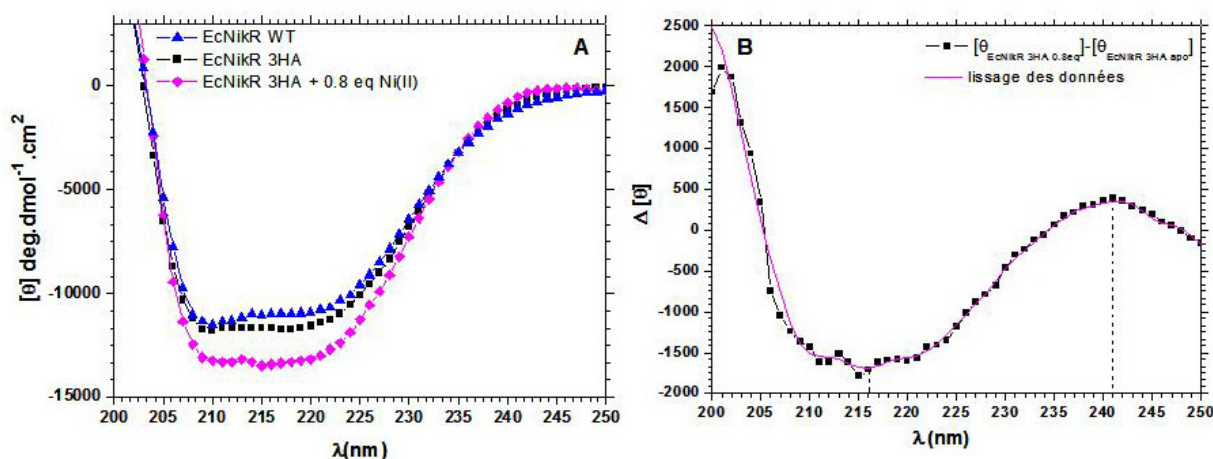


Figure II.9 Structuration d'EcNikR 3HA-WT à 10 μ M suivie par dichroïsme circulaire A) Spectres CD enregistrés dans l'UV lointain et normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus par sous unité (WT : \blacktriangle ; 3HA : \blacksquare ; et 3HA avec 0.8 équivalent de nickel : \blacklozenge). Les spectres ont été enregistrés dans du tampon MOPS 20mM pH7, KCl 40mM à 20°C. Le spectre du tampon est soustrait de chaque courbe expérimentale. B) Spectre de différence entre le mutant métallé par 0.8 eq de nickel et le mutant apo.

Un comportement similaire a été observé dans la littérature pour la protéine EcNikR WT, si ce n'est que le minimum sur le spectre de différence a été observé pour une longueur d'onde comprise entre 218 et 220 nm. Cette variation correspondrait à une structuration de la protéine par le nickel (Chivers & Sauer, 2002). Ceci a été confirmé lors de la résolution de la structure cristallographique de la protéine. En effet d'après les données RX, la présence de nickel favorise la structuration de l'hélice α 3 et entraîne un mouvement de la boucle située entre les brins β 3 et β 4 (Schreiter *et al.*, 2003).

Dans le cas du mutant 3HA, les 3 résidus mutés sont situés dans la boucle entre l'hélice α 3 et le brin β 3 d'après la prédiction de structure secondaire faite sur JPRED. Cependant une telle prédiction avait également été faite pour EcNikR WT et d'après les données RX, les 3 histidines sont dans l'extrémité terminale de l'hélice α 3 et non pas dans la boucle. La différence existante entre les deux spectres des protéines WT et 3HA reflète une différence de structuration nette. Les 3 alanines sont peut-être dans la boucle entre l'hélice α 3 et le brin β 3.

II.5.2.2.3. La structure tertiaire de EcNikR 3HA

Le spectre CD dans l'UV-proche d'EcNikR 3HA apo présente une bande large centrée sur 278 nm qui témoigne de la structure tertiaire de la protéine. Elle serait due principalement à une contribution des tyrosines (Figure II.10A) (Kenig *et al.*, 2001). Ce spectre de CD est similaire à celui observé pour EcNikR WT (Figure II.10B).

EcNikR comprend 3 résidus « tyrosine » par sous unité, 2 sont situés dans le domaine C-ter et le troisième est localisé dans le domaine N-ter. EcNikR native présente donc 8 tyrosines dans

le « cœur » de la protéine qui sont proches du site de haute affinité, et 2 tyrosines par domaine de liaison à l'ADN (Figure II.11).

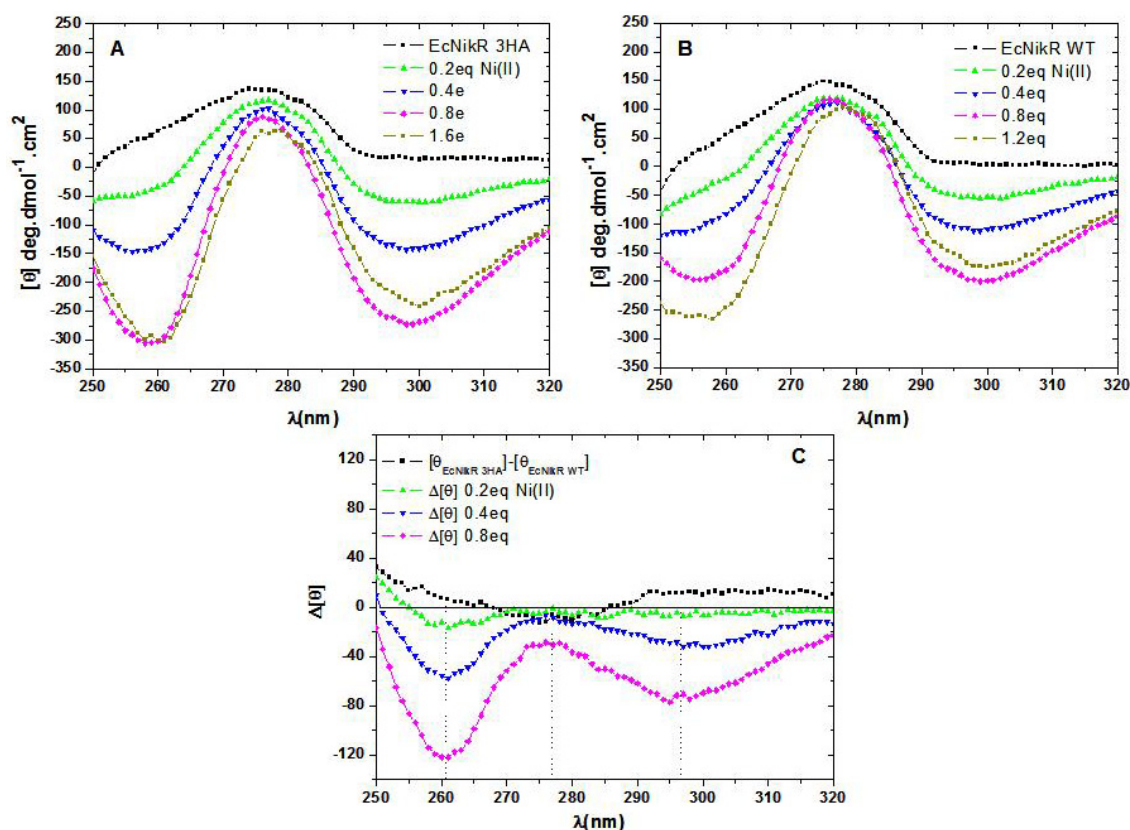


Figure II.10 Structuration d'EcNikR 3HA et WT à 15 μ M suivie par dichroïsme circulaire dans l'UV proche A) Spectres CD enregistrés dans l'UV proche et normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus de EcNikR 3HA. B) Spectres enregistrés avec EcNikR WT. Les spectres ont été enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7, 40mM KCl à 20°C, sur les protéines apo et en présence de nickel après 10 min d'incubation. Le spectre du tampon (avec les différents ajouts de nickel) est soustrait de chaque courbe expérimentale. C) Spectre de différence entre EcNikR 3HA et EcNikR WT.

L'environnement des résidus aromatiques doit être similaire pour les deux protéines. L'addition de nickel sur le mutant et la protéine WT modifie l'allure générale des spectres CD avec l'apparition de deux bandes avec un minimum à 260 et à 298 nm. Ces bandes seraient équivalentes aux bandes observées en UV-visible lors de la métallation du site de haute affinité (Chivers & Sauer, 2000). Les spectres de différences entre le mutant et la protéine sauvage (Figure II.10C) montrent que le nickel modifie plus l'intensité de l'ellipticité molaire du mutant sans qu'aucune variation des minima ne soit notable. Ces variations reflètent peut-être un positionnement différent des aromatiques par rapport au site de haute affinité.

La délétion du cluster d'histidines pourrait modifier également la structuration « au niveau tertiaire » de la protéine. Elle serait corrélée à la liaison du nickel dans le site dit de haute affinité.

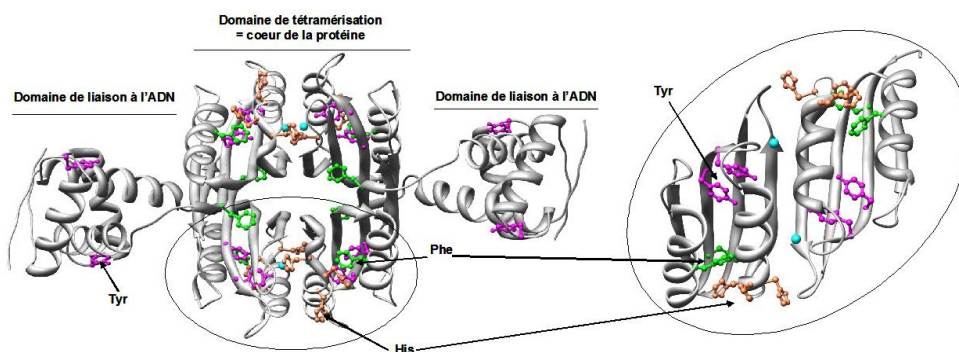


Figure II.11 Structure tridimensionnelle de EcNikR WT métallée (Schreiter *et al.*, 2006). En violet : les résidus « tyrosine », en vert : les résidus « phénylalanine », en orange : les résidus « histidines mutées en alanine » et en bleu : le Nickel

II.5.2.3. Propriétés de métallation

Le mutant EcNikR 3HA a initialement été construit afin de vérifier l'hypothèse que le cluster d'histidines H77 à 79 était impliqué dans l'agrégation de la protéine. La métallation de cette protéine par le nickel a donc été suivie en spectroscopie d'absorption UV-Vis (Figure II.12). Suite à l'addition de nickel sur la protéine EcNikR 3HA apo, des bandes à 302 et 460 nm caractéristiques de la métallation du site dit de haute affinité par le Ni(II) apparaissent (Figure II.12A et B).

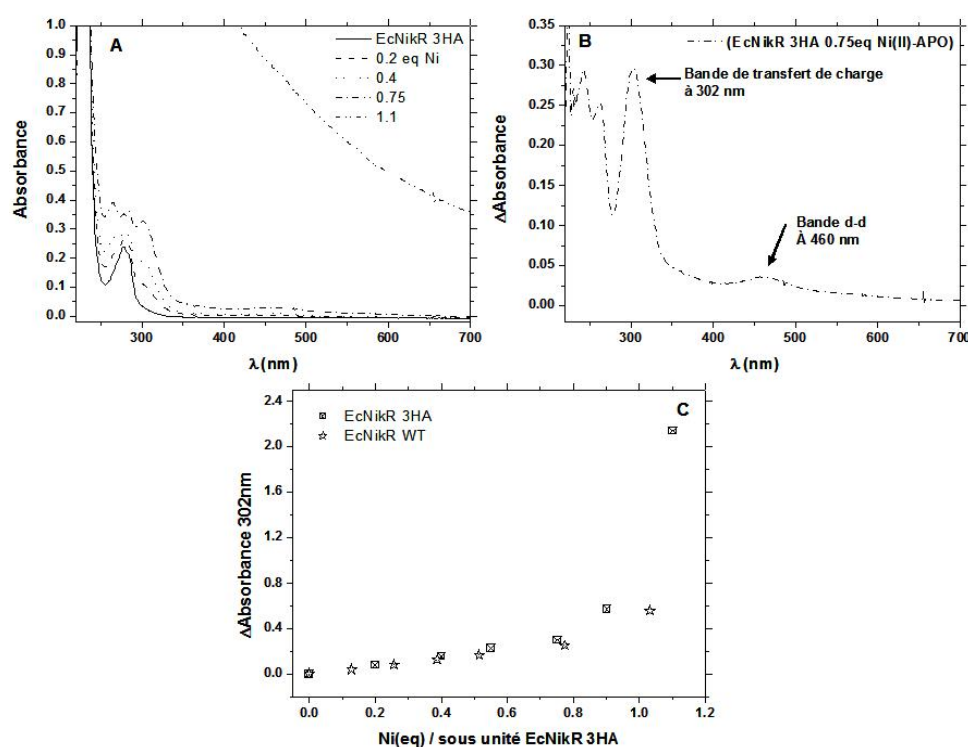


Figure II.12 Métallation du mutant EcNikR 3HA par le nickel dans du tampon 20 mM HEPES pH8 100mM NaCl. A) Spectres d'absorption UV-Vis de EcNikR 3HA à 48µM à l'état apo et en présence de différents équivalents de nickel. B) Spectre de différence entre Ni-EcNikR 3HA (0,75 eq de Ni(II)) et apo. C) Titration de EcNikR WT et 3HA par le nickel, suivi de l'absorption à 302nm en fonction de la quantité de nickel ajouté (NiCl₂).

La métallation dans le site dit de haute affinité a lieu jusqu'à 1 équivalent de nickel ajouté comme le montre la titration (Figure II.12C). L'épsilon apparent mesuré qui est de $8300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, est comparable à celui mesuré pour EcNikR WT dans les mêmes conditions.

Ces données suggèrent que la mutation du cluster d'histidine n'affecte pas la liaison du métal dans son site spectroscopique.

A partir de 0,9 équivalent de nickel ajouté, la protéine 3HA tend à s'agréger. Ce comportement est similaire à celui observé pour EcNikR WT. Ce résultat suggère que la délétion du cluster d'histidines ne modifie pas la sensibilité de la protéine vis-à-vis de l'agrégation Ni-dépendante.

Il serait toutefois intéressant de mesurer l'impact de cette mutation sur la cinétique de métallation du site de haute affinité par stopped-flow et de la comparer à celle mesurée pour EcNikR (Diederix *et al.*, soumis à publication). En effet ces trois histidines sont situées à l'embouchure du site de haute affinité, elles pourraient donc modifier l'incorporation du métal dans le site de haute affinité comme le suggèrent éventuellement les mesures en CD et modifier les capacités de liaison à l'ADN.

Il existe de nombreux autres sites potentiels à nickel chez EcNikR n'impliquant pas le cluster d'histidines comme cela a été montré dernièrement lors de la résolution de la structure cristallographique du complexe EcNikR-ADN mis en présence d'un excès de Ni(II) (trempage des cristaux dans du Ni(II)) (Schreiter *et al.*, 2006).

Nous pensons que ces sites pourraient être impliqués dans l'agrégation de la protéine résultant en une liaison non spécifique à l'ADN et une estimation erronée de l'affinité de la protéine pour l'ADN. En effet les propriétés de liaison à l'ADN d'EcNikR sont particulières comme nous allons le voir.

II.6. La liaison à l'ADN de EcNikR

II.6.1. Détermination de la stoechiométrie de liaison EcNikR:ADN

Afin de déterminer la stoechiométrie de liaison d'EcNikR sur sa boîte *pnikA*, les complexes ADN/Protéine ont été visualisés par la technique des retards sur gel et le tout a été analysé par la méthode de Ferguson (cf. Matériel & Méthodes). La séquence oligonucléotidique de 46 pb utilisée pour cette étude, comprenant le motif 6-16-6 pb lié par EcNikR, présentait en l'extrémité 5' une sonde fluorescente, la fluorescéine (notée Fl) pour visualiser l'ADN (Figure II.13). Cette même séquence a été utilisée pour mesurer la liaison à l'ADN de EcNikR WT et Q2E en anisotropie de fluorescence.

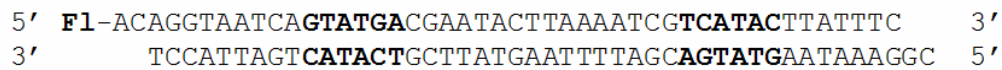


Figure II.13 Séquence de 46 pb présentant le motif lié (en gras) par EcNikR sur le promoteur *pnikA*. Une sonde fluorescente en 5' (fluorescéine) a été ajoutée afin de visualiser l'ADN.

La technique des retards sur gel a permis de visualiser trois complexes Protéine:ADN ayant des poids moléculaire apparents de 86, 190 et 224 kDa (Figure II.14). Le poids moléculaire apparent de l'ADN est de 37 kDa (versus 30 kDa théorique). Le complexe de 86 kDa correspondrait à la liaison de 1 tétramère pour 1 ADN (1:1). Ce complexe n'est visualisé qu'à partir de 5 μ M de protéine pour un rapport de concentration protéine/ADN de 50.

Ce complexe est observable pour des concentrations croissantes en protéine, mais il est associé à deux autres complexes. Le complexe à 190 kDa correspondrait soit à un complexe 2:1 soit 2:2 et le complexe à 224kDa correspondrait soit à un complexe 3:1 soit 3:2 (complexe Protéine:ADN)

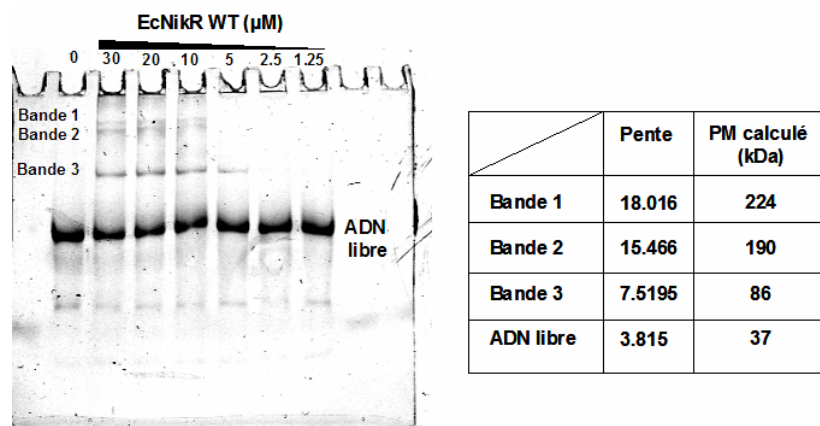


Figure II.14 Retards sur gel visualisés par fluorescence montrant la migration de l'ADN. EcNikR WT (1.25 μ M – 30 μ M) a été incubée avec 100nM de *pnikA*-Fl en présence de 10 μ M de Ni(II) et de dIdC à 100 μ g/mL. Le gel (à 8%) et le tampon de migration contiennent également du Ni(II) à 10 μ M. Le poids moléculaire apparent des

différents complexes a été déterminé après réalisation d'un jeu de gel permettant de déterminer la pente caractéristique du complexe et le report de cette dernière sur la courbe de calibration (montrée en Matériel & Méthodes).

La stoechiométrie de liaison d'EcNikR WT à l'ADN que nous avons déterminé par la technique de Ferguson a confirmé la stoechiométrie qui avait été proposée en utilisant uniquement la technique des gels retard par l'équipe de D. Zamble (Bloom & Zamble, 2004). Les conditions appliquées mettaient en présence 50nM d'ADN spécifique (100pb) avec 35µM de Ni(II) et une gamme de protéine allant de 25 nM à 500nM[†]. La liaison maximale de l'ADN avait été observée pour des rapports Protéine:ADN égaux ou supérieurs à 4.

L'absence de complexe protéine:ADN (rapport 12.5 et 25) en présence d'un excès de métal dans nos conditions n'est pas en accord avec les données de la littérature. En effet *a priori* l'affinité pour l'ADN serait de 20 pM (Bloom & Zamble, 2004). L'ADN fluorescent devrait être totalement complexé et ce n'est pas le cas.

Cependant si la protéine est amenée à précipiter (cf. ses caractéristiques de métallation), il est possible qu'elle ne puisse plus lier l'ADN spécifique, ou au contraire le lier ainsi que l'ADN compétiteur de façon aléatoire. Une telle hypothèse permettrait d'expliquer l'observation des complexes à 190 et 224 kDa après qu'une saturation de l'ADN compétiteur ait eu lieu.

Le caractère agrégatif Ni-dépendant d'EcNikR semble perturber l'étude de sa liaison à l'ADN.

II.6.2. La liaison à l'ADN suivie par anisotropie de fluorescence

Les liaisons à l'ADN de EcNikR WT et Q2E sur la séquence *pnikA-Fl* (utilisée en gel retard ci-avant) ont été mesurées par anisotropie de fluorescence dont le principe est brièvement expliqué en Matériel et Méthodes. Lorsque la protéine se lie à l'ADN, cela se traduit par une augmentation de l'anisotropie (*r*) de la sonde fluorescente (la fluorescéine ici).

La liaison totale d'EcNikR WT et Q2E à *pnikA-Fl* a été suivie au cours de titrations par le nickel en absence d'ADN compétiteur (Figure II.15). Leur liaison spécifique a également été suivie en présence d'ADN compétiteur (poly dIdC) (Figure II.15).

[†] Concentration en sous unité monomérique

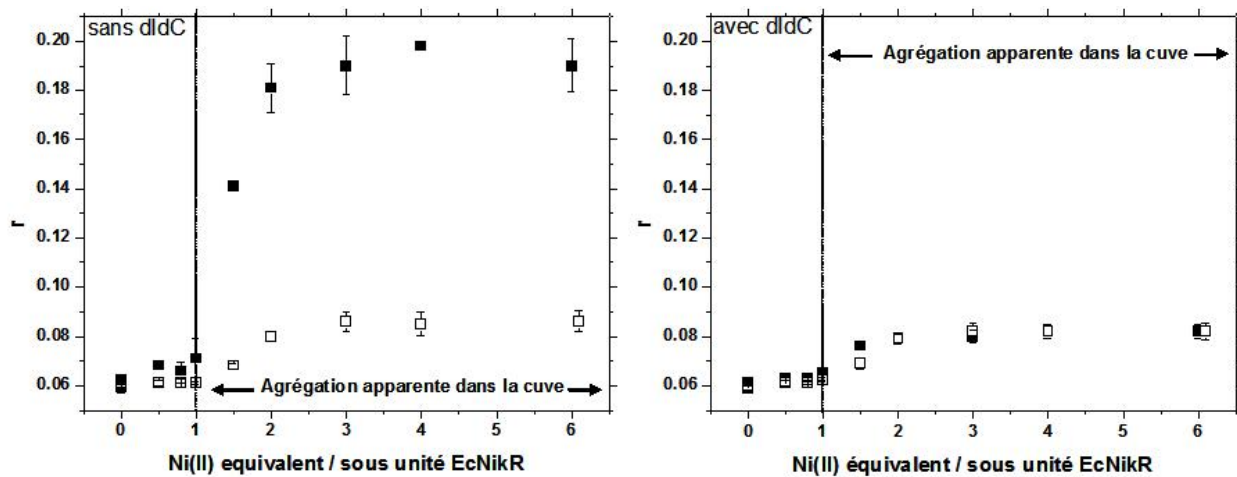


Figure II.15 Liaison à l'ADN suivie par anisotropie de fluorescence au cours d'une titration par le nickel. 10 nM de *pnikA*-Fl, 2,5 µM de protéine (WT : ■ ; Q2E : □) sont mis en présence dans un tampon 20 mM MOPS pH7, 150 mM KCl, 12 mM MgSO₄, avec ou sans dIdC à 10 µg/mL. r_{\max} du système : 0,2.

On peut remarquer que la liaison à l'ADN d'EcNikR WT et Q2E diffère en absence d'ADN compétiteur (r_{\max} WT : 0,2 et r_{\max} Q2E : 0,085) alors qu'elle est similaire en présence d'ADN compétiteur (r_{\max} : 0,082). EcNikR WT tend à lier significativement l'ADN de façon aspécifique. Les liaisons non-spécifique et spécifique à l'ADN des protéines sont concomitantes et sont observées dans des conditions d'agréations. Ces observations sont en accord avec les résultats que nous avons concernant la liaison d'EcNikR à *pnikA* mesurée par un test de protection à la nucléase (Fauquant *et al.*, 2006).

EcNikR WT tend à s'agréger sur l'ADN spécifique en absence d'ADN compétiteur. Bien qu'EcNikR Q2E ait les mêmes propriétés de métallation et d'agréation qu'EcNikR WT, elle ne se comporte pas de la même façon face à l'ADN. EcNikR Q2E agrégée ne semble pas se lier à l'ADN.

La liaison spécifique d'EcNikR WT et Q2E sur *pnikA* débute à partir de 1 équivalent et est maximale à 2,5-3 équivalents de nickel ajoutés par sous unité.

Les conditions expérimentales imposées supposent que le facteur limitant pour la liaison à l'ADN ne soit pas la protéine (excès de 62,5x par rapport à la concentration en ADN) mais plutôt la concentration en nickel. La proportion de protéine activée est dépendante de l'affinité relative de cette dernière pour le métal. 50% de liaison à l'ADN est observable pour 1,5 eq de Ni(II) soit 3,8 µM. Si l'affinité du site de haute affinité d'EcNikR pour le Ni(II) était de 7 pM, alors plus de 90% de la protéine serait active à 3,8 µM, il en serait de même si le K_d était plutôt submicromolaire (K_d~100 nM) comme nous le pensons. La liaison à l'ADN devrait également être maximale même en considérant un K_d moyen de liaison à l'ADN de 20 nM (Bloom & Zamble, 2004) en présence de 1 comme de 1,5 équivalents de Ni(II).

Les données ne sont pas ajustables par un modèle simple, l'allure est de type sigmoïdale (notion de coopérativité). D'après ces données, la simple métallation des 4 sites de haute affinité ne suffirait pas pour observer la liaison à l'ADN d'EcNikR par cette technique. La liaison du nickel dans des sites annexes assurerait la liaison à l'ADN. Le fait que la liaison d'EcNikR-Ni(II) à l'ADN soit de nature coopérative a déjà été décrit dans la littérature. Cependant cette liaison pouvait être mesurée en conditions stoechiométriques, ce qui n'est pas le cas ici. Il ne faut pas oublier que dans les expériences d'empreinte à la DNaseI (liaison à l'ADN en conditions stoechiométriques), le tampon de complexation comprenait toujours du K^+ qui pourrait éventuellement être lié par EcNikR (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2000). Il est également possible qu'EcNikR se lie à *pnikA-Fl* entre 0 et 1 équivalent de Ni(II) ajouté mais que nous ne puissions pas mesurer cette liaison (bruit de fond). Les variations d'anisotropie sont très faibles. Ces conditions expérimentales ne sont pas optimales pour étudier la liaison d'EcNikR à l'ADN.

II.7. Discussion et Conclusion

II.7.1. Liaison du nickel dans deux classes de sites métalliques

EcNikR WT et le mutant Q2E, lient 1 équivalent de Ni(II) par sous unité dans un site qualifié de site de haute affinité (HA). Ce site d'après la signature en spectroscopie d'absorption UV-Visible et la littérature présente une géométrie plan carré où le métal est coordonné par 3 résidus histidines et 1 résidu cystéine (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002; Leitch *et al.*, 2007; Schreiter *et al.*, 2003). La métallation du site HA ne serait pas directe mais passerait par la formation d'un état transitoire de métallation d'EcNikR, n'ayant pas de signature en UV-Visible, où le Ni(II) pourrait être coordonné par des ligands présents à son embouchure (Diederix *et al.*, soumis à publication).

La liaison du métal par EcNikR n'est pas limitée à la métallation du site HA. En effet EcNikR peut lier jusqu'à 8 Ni(II) par monomère, soit 32 Ni(II) par tétramère dont le K_d varie entre 0.2 et 12 μ M (Fauquant *et al.*, 2006). Dans ces conditions de métallation et pour des pH compris entre 6 et 8, EcNikR est agrégée. Cette caractéristique est minimisée dans la littérature pourtant elle perturbe l'étude des propriétés de métallation et de liaison à l'ADN d'EcNikR. Ce phénomène d'agrégation débute au-delà de 1 équivalent de Ni(II) ajouté par sous unité et est maximal à partir de 1,5 équivalents de Ni(II) ajoutés à EcNikR Q2E. La liaison de 2 Ni(II) supplémentaires aux 4 Ni(II) présents dans les sites HA est donc suffisante pour induire une agrégation maximale.

Ces sites métalliques présentent une affinité pour le Ni(II) proche de celle du site dit de haute affinité sinon les deux phénomènes ne se succéderaient pas aussi rapidement dans une titration métallique. Les deux phénomènes que sont la métallation et l'agrégation peuvent être dissociés en assurant une protonation des ligands de liaison (Fauquant *et al.*, 2006). Cette protonation diminue l'affinité de ces sites métalliques pour le Ni(II). Le pKa d'agrégation serait proche de 5.4, il est possible que les résidus protonés qui sont impliqués dans l'agrégation soient des histidines (pKa : 6) qui sont au nombre de 48 par tétramère. Il a été proposé que le cluster d'histidines (H77, 78, 79, 92) présent à l'embouchure du site de haute affinité soit non seulement le site de métallation transitoire facilitant l'incorporation du nickel dans le site HA mais aussi celui dont la métallation induirait l'agrégation de la protéine. L'étude du mutant 3HA, auquel 3 résidus du cluster ont été mutés (H77 à 79), a révélé que la structuration au niveau secondaire de la protéine était différente de la protéine sauvage. L'environnement terminal de l'hélice $\alpha 3$ serait affecté par la mutation. Malgré cette différence, le mutant a conservé ses propriétés de métallation (liaison de 1 équivalent Ni(II) par sous unité, puis agrégation au-delà). La précipitation que nous supposons dépendante de ce cluster ne l'est pas ou du moins pas uniquement (Fauquant *et al.*, 2006). Il serait intéressant de connaître la capacité de métallation de ce mutant, le nombre de sites affectés par cette mutation, la cinétique de métallation du site de haute affinité ainsi que les propriétés de liaison à l'ADN du mutant.

L'agrégation observée est un phénomène réversible « rapidement » en présence de chélateur comme l'EDTA. Les sites impliqués sont donc plutôt accessibles et exposés au solvant. La cinétique de chélation du Ni(II) contenu dans les sites HA par de l'EDTA est lente mais peut être accélérée en présence de CN^- (RD-IMS observations). Ce comportement sous-entend que la plus ou moins grande rapidité de chélation du Ni(II) ne dépend pas seulement de l'affinité de l'agent chélateur pour le métal mais aussi de son accessibilité au métal. Le Ni(II) du site HA est plutôt enfoui dans la protéine. Par ailleurs les changements conformationnels du domaine de tétramérisation (structuration de l'hélice $\alpha 3$, déplacement de la boucle entre $\beta 3$ et $\beta 4$) induit par la métallation de ce site par le Ni(II) tend à « bloquer » ce domaine. Mesurer la quantité de Ni(II) liée par EcNikR directement n'équivaut pas à la mesure de la quantité de Ni(II) liée par cette protéine en présence d'agent chélateur.

L'utilisation d'agents chélateurs comme l'EDTA ou encore l'EGTA n'est de ce fait pas appropriée pour faire une détermination indirecte de l'affinité du site HA pour le Ni(II) comme cela a pourtant été fait par les groupes de P. Chivers et D. Zamble (Chivers & Sauer, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Trois techniques de mesure directe ont donc été employées afin de revisiter les données concernant l'affinité du site HA d'EcNikR pour le Ni(II) où le K_d décrit est de l'ordre du picomolaire (Chivers & Sauer, 2002; Wang *et al.*, 2004). Il s'avère que ce dernier serait de l'ordre de la centaine de nanomolaires (K_D moyen de 82 ± 24 nM par la technique de liaison sur filtre, 379nM par titration en UV-Vis à l'équilibre et 363nM par cinétique rapide) (Diederix *et al.*, soumis à publication). Récemment des données similaires ont été proposées par le groupe de S. Ciurli pour HpNikR (Zambelli *et al.*, 2007) à laquelle une affinité de l'ordre du picomolaire pour le site HA avait été attribuée par le groupe de D. Zamble (Abraham *et al.*, 2006). Une technique directe a de nouveau été employée, il s'agit de mesures de calorimétrie (ITC). Les quatre sites de haute affinité d'HpNikR ne seraient pas tous équivalents mais égaux 2 à 2. Les deux premiers sites auraient un $K_{dNi(II)}$ proche de 10nM et les deux autres auraient un $K_{dNi(II)}$ proche de 100nM. L'affinité serait fonction du pH. Des sites de plus basse affinité ont également été décrits pour HpNikR en utilisant l'ITC. Nous sommes en contact avec le groupe de S. Ciurli pour tenter des mesures d'ITC sur EcNikR tout en sachant que les propriétés d'agrégation d'EcNikR risquent d'en limiter la faisabilité.

Le fait qu'EcNikR présente une constante de dissociation pour le Ni(II) de l'ordre de la centaine de nanomolaires semble plus cohérent avec des aspects physiologiques. Cette dernière est le métallorégulateur du Ni(II) chez *E.coli* et les principales protéines qui lient du Ni(II) chez les bactéries présentent une constante de dissociation pour le métal de l'ordre du μ M (HypA (Atanassova & Zamble, 2005), HypB (Olson *et al.*, 1997), UreE (Stola *et al.*, 2006), SrnQ (Kim *et al.*, 2003), Hpn (Ge *et al.*, 2006), SlyD (Hottenrott *et al.*, 1997)...). Si EcNikR présentait un K_d de l'ordre du pM, elle assurerait en permanence une répression de la transcription et les protéines liant du Ni(II) pour leur activité ne pourrait plus assurer leur fonction. Il semble donc plus probable qu'EcNikR ait une sensibilité pour le Ni(II) qui soit du même ordre de grandeur.

II.7.2. Fonction des sites secondaires

La présence de sites de basse affinité avait été suggérée pour expliquer le modèle de liaison à l'ADN en deux temps ($K_{d_{Ni2}}$: 30nM-30 μ M) (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2000; Chivers & Sauer, 2002). Bloom *et al.* avaient d'ailleurs avancé que les deux clusters H77-78-79-92' et H123-125-C128' pouvaient être des ligands potentiels du Ni(II).

D'après ce modèle, la liaison du Ni(II) dans le site de haute affinité d'EcNikR permettait la liaison de la protéine à l'ADN avec une affinité moyenne. La métallation de sites annexes présentant une affinité de l'ordre du micromolaire pour le métal permettait une liaison de la protéine à l'ADN avec une haute affinité.

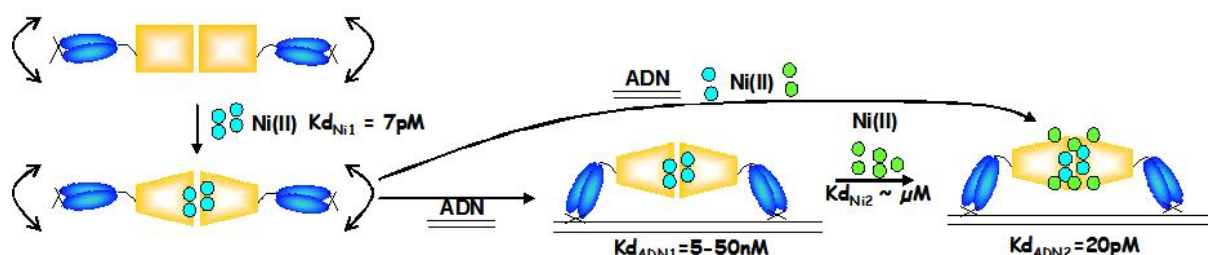


Figure II.16 Modèle de liaison à l'ADN par EcNikR (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2002), ● Ni(II) du site dit de haute affinité, ● Ni(II) des sites secondaires.

Ce modèle était fonction, entre autres, des propriétés de métallation de la protéine. En effet en considérant un $K_{d_{Ni1}}$ de 7pM pour le site HA, il était supposé que la protéine était 100% métallée et activable dans les conditions expérimentales testées. Seulement en considérant que le $K_{d_{Ni1}}$ n'est pas de 7 pM mais plutôt de l'ordre de 100nM, il est fort probable qu'une partie de la protéine utilisée, dans les expériences de liaison à l'ADN en conditions stoechiométriques, n'était pas active. La constante de dissociation ou $K_{d_{ADN1}}$ est sans doute légèrement surestimée. L'excès de Ni(II) nécessaire en EMSA permettrait alors de saturer les sites de haute affinité. Une détermination d'un $K_{d_{ADN1}}$ plus juste serait alors envisageable (proche du $K_{d_{ADN2}}$), l'implication de deux sites métalliques ne serait pas nécessaire. Mais cette hypothèse ne tient pas compte de la capacité de liaison métallique et du caractère agrégatif de la protéine.

La présence de sites métalliques secondaires à Ni(II) a été confirmée par notre étude (Fauquant *et al.*, 2006) et lors de la résolution de la structure du complexe EcNikR-Ni-ADN où les cristaux avaient été trempés dans une solution à 5mM de Ni(II). Six autres sites métalliques en plus du site de haute affinité (noté 0 sur la [Figure II.17](#)) et d'un site à K^+ ont été observés (Schreiter *et al.*, 2006).

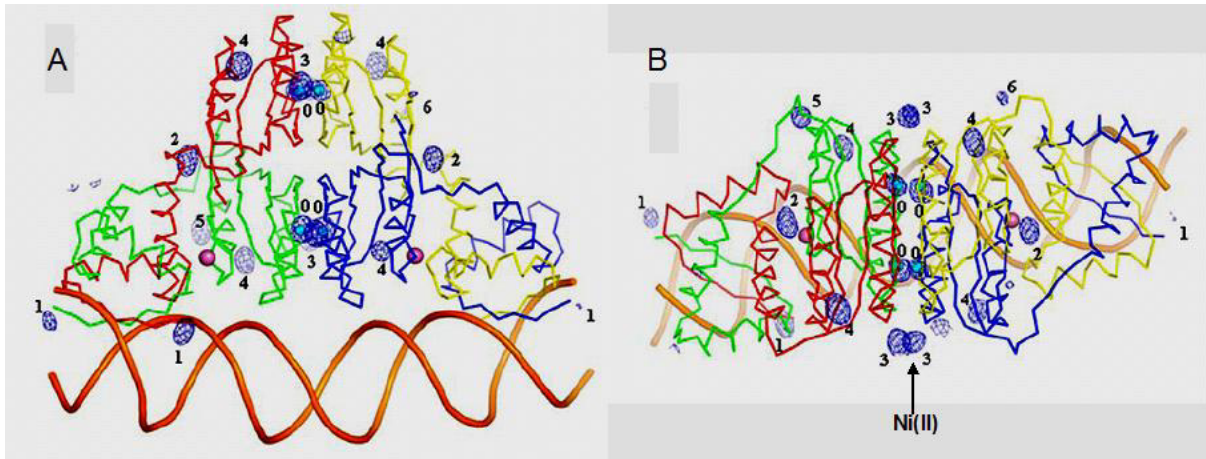


Figure II.17 Structure tridimensionnelle du complexe EcNikR-Ni-ADN sur laquelle a été superposée l'emplacement des Ni(II) (●) liés à la protéine après que le complexe ait été trempé dans 5mM de Ni(II). 15 Ni(II) supplémentaires ont été visualisés sur le complexe en plus des 4 sites de hautes affinités et des 2 sites à K^+ (Schreiter *et al.*, 2006).

Ces sites secondaires à Ni(II) de basse affinité ne semblent pas directement impliqués dans la liaison à l'ADN (Schreiter *et al.*, 2006). La structure du complexe EcNikR-Ni-ADN trempé dans du Ni(II) ne diffère pas de la structure avant trempage des cristaux. Il a été suggéré que l'effet de ces nickels supplémentaires ne serait pas structural mais plutôt électrostatique. Ils permettraient d'augmenter l'affinité d'EcNikR pour l'ADN en augmentant la charge positive de la protéine (Schreiter *et al.*, 2006).

Cette hypothèse de « répulsion-attraction » permettrait d'expliquer pourquoi EcNikR WT et Q2E ne présentent pas le même comportement face à l'ADN. Ces deux protéines présentent les mêmes propriétés de métallation et d'agrégation en absence d'ADN. La liaison du Ni(II) augmente alors tout autant la charge positive d'EcNikR WT que d'EcNikR Q2E. Pourtant EcNikR WT présente un comportement de liaison à l'ADN plus aspécifique que le mutant Q2E. EcNikR WT agrégée se lierait plus à l'ADN. Le mutant Q2E présente deux charges négatives (E2) supplémentaires dans son domaine de liaison à l'ADN. Une répulsion entre le domaine de liaison à l'ADN d'EcNikR Q2E et les groupements phosphates pourrait avoir lieu et déstabiliser les liaisons hydrogènes opérées par les résidus R3 et T5 avec l'ADN.

Un site métallique liant du K^+ dans la structure a été identifié. Les résidus Glu30 et Asp34 (résidus conservés parmi les membres de la famille NikR) de ce site seraient indispensables pour observer un complexe ADN/Protéine en EMSA.

Un site équivalent chez PhNikR a été décrit, à la différence près que ce site liait du Ni(II) (Chivers & Tahirov, 2005).

Récemment, Leitch *et al.* ont proposé que le second site métallé par du Ni(II) observé au cours de leur travaux soit un site proche du site à K^+ décrit dans la structure du complexe ADN/Protéine. Cependant il n'y a aucune preuve de la localisation de ce site. Il ne faut pas oublier qu'EcNikR peut lier jusqu'à 8 Ni(II) par sous unité. Ce site présenterait une géométrie octaédrique et impliquerait 2 résidus imidazoles ainsi que 4 ligands N/O (Leitch *et al.*, 2007). Il ne serait (bien) formé qu'en présence d'ADN et présenterait une stoechiométrie de 2 Ni(II) par tétramère. Cette stoechiométrie est directement liée à la quantité de métal ajoutée lors de cette étude. Dans cette condition (présence d'ADN), la protéine serait moins sujette à la précipitation. Cet aspect n'est pas évident si l'on considère les résultats obtenus en EMSA et en anisotropie dans notre étude.

Nous pensons que les sites de basse affinité à Ni(II) sont directement responsables de l'agrégation de la protéine. Ce comportement perturberait l'étude de la liaison à l'ADN en provoquant une liaison aspécifique de la protéine agrégée à l'ADN (mesure en gel retard – anisotropie). Les équilibres de liaison à l'ADN seraient perturbés en présence d'excès de Ni(II).

II.7.3. Mécanisme d'action d'EcNikR

Au regard des données de la littérature et des données obtenues, un mécanisme d'action d'EcNikR peut être proposé (Figure II.18).

EcNikR apo ne peut pas se lier sur sa séquence opératrice *pnikA*.

La métallation de ses sites de haute affinité (HA) couplée à la métallation d'un site à K^+ ou éventuellement à Ni(II) lui permettrait de se lier à l'ADN. Les sites de haute affinité ne présenteraient pas une constante de dissociation de l'ordre du picomolaire mais plutôt de l'ordre du submicromolaire. Dans ces conditions de métallation, EcNikR se lierait à l'ADN avec un K_d inférieur ou égal au nanomolaire.

L'addition de Ni(II) supplémentaire à la protéine métallée induit une agrégation massive de cette dernière qui est corrélée à la métallation des sites de basse affinité. Ces sites qui sont au nombre de 7 par monomère, présentent une affinité de l'ordre du micromolaire (2,2 μ M). La réalité physiologique d'une forme agrégée d'EcNikR est sujette à discussion puisqu'il n'a jamais été mis en évidence un tel état de la protéine *in vivo*. EcNikR pourrait toutefois avoir une seconde fonction autre que la répression transcriptionnelle et qui serait le stockage du Ni(II). En effet *E. coli* n'a pas de protéine de stockage définie à la différence de micro-organismes tels que *Bradyrhizobium japonicum* avec HypB ou encore *Helicobacter pylori* avec Hpn. Cette dernière, d'ailleurs présentent des caractéristiques communes à

EcNikR : formation de multimères, liaison de 5 Ni(II) par sous unité, richesse en histidine (28 par sous unité), K_{dNi} : $7,1\mu M$, réversibilité d'agrégation en présence de chélateur.

Cependant, il se pourrait que cette fonction soit plutôt associée à la protéine SlyD. EcNikR agrégée n'aurait pas de réalité physiologique. SlyD qui est une peptidyl-prolyl isomérase avec des propriétés de chaperonnes (Hottenrott *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 2006) (limite l'agrégation de la citrate synthase dénaturée (Leach *et al.*, 2007)), tend à faciliter l'accumulation du Ni(II) chez *E. coli* (Zhang *et al.*, 2005). SlyD est en mesure de lier différents métaux dont 3 Ni(II) avec une affinité de l'ordre du micromolaire (Hottenrott *et al.*, 1997). Elle présente un domaine C-ter comprenant un stretch histidine (15H) proche de celui retrouvé chez HypB de *B. japonicum* et *R. leguminosarum*. Cette protéine serait également impliquée dans la maturation des hydrogénases (dont HycE la 3^{ème} hydrogénase) en interagissant avec HypB et en facilitant le relargage du Ni(II) contenu dans le site de haute affinité de HypB (Leach *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2005). Il a été proposé qu'un ou plusieurs facteurs de la maturation de HycE (inductible par le formate) perturbent l'activité de NikR (Rowe *et al.*, 2005). L'un de ces facteurs pourrait être SlyD bien que son activation par le formate n'ait pas été rapportée. Elle pourrait empêcher l'agrégation de la protéine *in vivo* en liant le trop plein de métal. Elle pourrait également entrer en compétition avec EcNikR et faciliter le relargage du Ni(II) de son site de haute affinité comme elle le fait pour HypB. Cela impliquerait une interaction entre SlyD et NikR. Aucune relation entre ces deux protéines n'a jusqu'à alors été mise en évidence mais il serait intéressant de l'étudier.

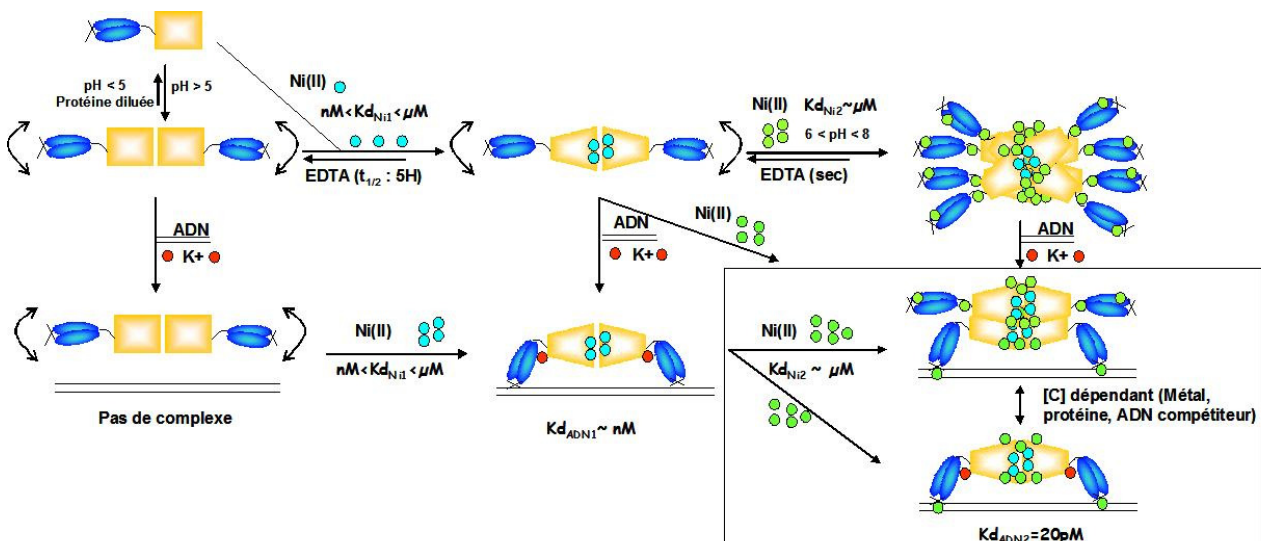


Figure II.18 Mécanisme d'activation et d'action d'EcNikR. Le cadre délimite un aspect du mécanisme qui pourrait ne pas avoir de réalité physiologique.

L'addition de Ni(II) supplémentaires au complexe EcNikR-Ni-ADN, ne modifie pas la structure de ce dernier. L'effet des nickels serait de nature électrostatique et non pas structural. Le K_d d'EcNikR-Ni à l'ADN serait diminué en présence d'un large excès de Ni(II) en raison de l'activation totale de la protéine et/ou en raison de l'effet attractif imposé par le métal (caractère stabilisateur du complexe).

La réalité physiologique des deux niveaux de régulation proposés pour l'interaction avec l'ADN est à remettre en question. En effet, aucun métallorégulateur n'a jusqu'à présent été présenté comme ayant deux niveaux de « verrouillages » du contrôle de la transcription. Son homologue chez *H. pylori* partage de nombreuses propriétés de métallation et de liaison à l'ADN (Abraham *et al.*, 2006; Fauquant *et al.*, 2006). Cependant elle ne présente pas deux niveaux de régulation alors qu'elle nécessite, elle aussi, un excès de cations pour que son complexe HpNikR-Ni-ADN soit visualisé en EMSA (Abraham *et al.*, 2006). D'autre part HpNikR présente aussi un K_{dNi} d'une centaine de nanomolaires pour le site HA (Zambelli *et al.*, 2007) mais par contre ne présente pas un caractère agrégatif aussi prononcé qu'EcNikR (Fauquant *et al.*, 2006). Son K_d pour l'ADN en présence d'un excès de métal n'est que faiblement amélioré de ~ 50 nM à 3-4 nM (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007). Il pourrait en être de même pour EcNikR si cette dernière ne liait pas autant de métal et n'agrégeait pas *in vitro*.

Il a jusqu'à présent toujours été considéré que la liaison du Ni(II) au site de haute affinité d'EcNikR s'effectuait simplement sans qu'aucun partenaire extérieur autre que l'ion Ni(II) ne soit associé. Toutefois, un modèle aussi simple ne reflète pas la complexité cellulaire. En 2005, le groupe de J. Fontecilla-Camps a proposé que la protéine périplasmique du Ni(II) chez *E. coli*, NikA, ne liait pas directement le métal mais plutôt un complexe « Ni-nickelophore » (Cherrier *et al.*, 2005) qui jouerait une fonction analogue au sidérophore pour le fer (ferrichrome). La nature de cette molécule est en cours d'identification. Il pourrait s'agir soit de 1,2,4-tricarboxylate butane soit de 1,2,3-tricarboxylate propane.

Une telle molécule pourrait être véhiculée dans le cytoplasme bactérien pour ensuite apporter le Ni(II) aux protéines impliquées dans la maturation des hydrogénases ou encore à EcNikR. La formation d'un complexe ternaire nickelophore/Ni(II)/EcNikR pourrait être envisagée. Un tel complexe pourrait modifier les propriétés de métallation décrites jusqu'à présent sur le système EcNikR-Ni. Il pourrait être intéressant de regarder si un tel complexe existe *in vivo* ou peut être constitué *in vitro*.

II.8. Références

- Abraham, L. O., Li, Y. & Zamble, D. B. (2006). The metal- and DNA-binding activities of *Helicobacter pylori* NikR. *J Inorg Biochem* 100, 1005-1014.
- Atanassova, A. & Zamble, D. B. (2005). *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J Bacteriol* 187, 4689-4697.
- Benanti, E. L. & Chivers, P. T. (2007). The N-terminal arm of the *Helicobacter pylori* Ni²⁺-dependent transcription factor NikR is required for specific DNA-binding. *J Biol Chem* 282, 20365-75.
- Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Metal-selective DNA-binding response of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10029-10038.
- Cherrier, M. V., Martin, L., Cavazza, C., Jacquamet, L., Lemaire, D., Gaillard, J. & Fontecilla-Camps, J. C. (2005). Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H₂O)- to the periplasmic nickel transporter NikA. *J Am Chem Soc* 127, 10075-10082.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2000). Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni²⁺-Dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem* 275, 19735-19741.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2002). NikR repressor: high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA. *Chem Biol* 9, 1141-1148.
- Chivers, P. T. & Tahirov, T. H. (2005). Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol* 348, 597-607.
- Diederix, R. E., Fauquant, C., Rodrigue, A., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (soumis à publication). Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II).
- Fauquant, C., Diederix, R. E., Rodrigue, A., Dian, C., Kapp, U., Terradot, L., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (2006). pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* NikR. *Biochimie* 88, 1693-1705.
- Ge, R., Watt, R. M., Sun, X., Tanner, J. A., He, Q. Y., Huang, J. D. & Sun, H. (2006). Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*. *Biochem J* 393, 285-293.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G. & Rahfeld, J. U. (1997). The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem* 272, 15697-15701.
- Kelly, S. M. & Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 1, 349-384.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751, 119-139.
- Kenig, M., Jerala, R., Kroon-Zitko, L., Turk, V. & Zerovnik, E. (2001). Major differences in stability and dimerization properties of two chimeric mutants of human stefins. *Proteins* 42, 512-522.
- Kim, J. S., Kang, S. O. & Lee, J. K. (2003). The protein complex composed of nickel-binding SrnQ and DNA binding motif-bearing SrnR of *Streptomyces griseus* represses sodF transcription in the presence of nickel. *J Biol Chem* 278, 18455-18463.
- Leach, M. R., Zhang, J. W. & Zamble, D. B. (2007). The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* 282, 16177-16186.

- Leitch, S., Bradley, M. J., Rowe, J. L., Chivers, P. T. & Maroney, M. J. (2007). Nickel-specific response in the transcriptional regulator, *Escherichia coli* NikR. *J Am Chem Soc* 129, 5085-5095.
- Martell, A. E. & Smith, R. M. (1974). In *Critical Stability Constants*, pp. 269-272. New York: Plenum Press.
- Olson, J. W., Fu, C. & Maier, R. J. (1997). The HypB protein from *Bradyrhizobium japonicum* can store nickel and is required for the nickel-dependent transcriptional regulation of hydrogenase. *Mol Microbiol* 24, 119-128.
- Rowe, J. L., Starnes, G. L. & Chivers, P. T. (2005). Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 6317-6323.
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2006). SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* 45, 20-33.
- Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T. & Drennan, C. L. (2003). Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* 10, 794-799.
- Schreiter, E. R., Wang, S. C., Zamble, D. B. & Drennan, C. L. (2006). NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13676-13681.
- Stola, M., Musiani, F., Mangani, S., Turano, P., Safarov, N., Zambelli, B. & Ciurli, S. (2006). The nickel site of *Bacillus pasteurii* UreE, a urease metallo-chaperone, as revealed by metal-binding studies and X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* 45, 6495-6509.
- Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10018-10028.
- Zambelli, B., Bellucci, M., Danielli, A., Scarlato, V. & Ciurli, S. (2007). The Ni(2+) binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)*, 3649-3651.
- Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A. & Zamble, D. B. (2005). A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 280, 4360-4366.

Chapitre III

HpNikR et les métaux

III.1. L'objectif de l'étude

Au commencement de cette étude, HpNikR était connue comme étant un régulateur transcriptionnel global, dont la fonction était Ni(II)-dépendante. Toutefois aucune caractérisation des propriétés de métallation n'était décrite dans la littérature. Il était de ce fait intéressant de les étudier afin de les comparer à celles d'EcNikR. D'autant plus qu'à cette époque nous venions de regarder l'effet du pH sur la métallation d'EcNikR. Un tel facteur pouvait avoir une influence non négligeable sur les propriétés de métallation d'HpNikR en raison des liens existants entre le Ni(II) et le pH chez *Helicobacter pylori*.

La caractérisation de ces propriétés a également été initiée afin de faciliter la compréhension et l'interprétation des données structurales d'HpNikR. En effet l'équipe de Laurent Terradot (ESRF Grenoble) qui avait résolu les structures RX d'HpNikR Apo et Holo, avait obtenu des structures avec les états de métallations suivants (Dian *et al.*, 2006) :

- soit 4 sites dits intermédiaires « bis »
- soit 2 sites dits de haute affinité par analogie à ceux d'EcNikR, 2 sites intermédiaires et 2 sites externes

HpNikR était-elle capable de lier 4 nickels dans ces sites de haute affinité, bien qu'aucune structure RX de la sorte n'ait été observée ? Le site dit de haute affinité et le site intermédiaire ont des ligands communs et ne peuvent de ce fait pas coexister dans une stoechiométrie 4:4. Les sites dits de haute affinité sont-ils tous équivalents dans la mesure où la métallation semble aller par paire d'après la structure ?

Dans un premier temps, la mise au point d'un nouveau protocole de purification permettant l'obtention de protéine apo a été nécessaire. Puis dans un second temps, la comparaison des propriétés d'EcNikR et d'HpNikR a été initiée.

III.2. Purification d'HpNikR WT

La protéine NikR d'*Helicobacter pylori* a été obtenue à partir d'une souche BL21(DE3) d'*E.coli* surproductrice et a été purifiée selon un protocole mis au point au laboratoire et décrit en Matériel et Méthodes. Ce protocole diffère des protocoles décrits dans la littérature. Ces derniers imposaient l'utilisation au minimum d'une colonne d'affinité chargée en Ni(II) (Abraham *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2003; Delany *et al.*, 2005; Dian *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2005). La protéine purifiée, selon les études, était soit sauvage, soit « taggée » en Nter (His-tag ou Strep-tag). Ici la protéine purifiée est sauvage.

III.2.1. L'obtention des extraits protéiques

Le gène *hpnikR* a été cloné dans un plasmide pET11a où il est sous contrôle d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase du phage T7 (Dian *et al.*, 2006). Ce plasmide contient un gène conférant la résistance à l'ampicilline. Le plasmide, nommé pILL695, a été introduit par choc thermique dans la souche surproductrice d'*E.coli* BL21(DE3). Cette dernière synthétise l'ARN polymérase du phage T7 qui est sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. La surproduction d'HpNikR est *in fine* induite (Figure III.1)

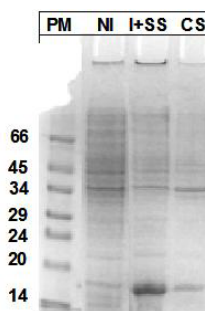


Figure III.1 Production de NikR d'*Helicobacter pylori* dans une souche BL21(DE3) d'*E.coli* inductible à l'IPTG contrôlée via un gel d'électrophorèse à 17% d'acrylamide en conditions dénaturantes. NI : profil protéique de la culture bactérienne avant induction ; I+SS : profil protéique du surnageant de culture après induction par de l'IPTG à 0.5 mM pendant 3H et cassage des cellules dans 20 mM Tris/HCl pH 7.4 contenant 100 mM EDTA, 0.5 mL de DMSO et 200 mg du cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma) ; CS : profil protéique des débris cellulaires culottés après cassage des cellules.

Afin de limiter la protéolyse de la protéine, un cocktail d'inhibiteurs de protéases (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatine A, E-64, bestatine, et de l'EDTA) (Sigma) est ajouté dans la suspension bactérienne avant le cassage des cellules par sonication. Environ 80% de la protéine surproduite sont récupérés après cette étape.

III.2.2. Purification sur une colonne échangeuse d'anions

Le choix de la première étape de purification a été déterminé par le point isoélectrique théorique d'HpNikR, pI = 5.2 (Swiss prot). C'est une protéine riche en résidus acides (Asp : 12, Glu : 13 vs résidus basiques : 16). La protéine a été purifiée sur une colonne échangeuse d'anions, la Resource Q (Pharmacia Biotech), équilibrée avec un tampon Tris/HCl 20mM pH 7.4, NaCl 20 mM. Au préalable, l'extrait protéique est dialysé afin d'éliminer l'EDTA puis traité avec la DNaseI pour dégrader l'ADN. Dans ces conditions de pH, HpNikR, contenue dans le dialysat, est théoriquement chargée négativement et donc est retenue sur la colonne qui présente des groupements avec un ammonium quaternaire ($-NH_4^+$). L'élution d'HpNikR est permise par un gradient en NaCl allant de 100 à 400 mM (Figure III.2). L'ion chlorure sert de contre ion qui entre en compétition avec la protéine pour interagir avec le groupement

ammonium. L'ADN qui est également chargé négativement, est retenu sur la colonne. Il est élué pour des concentrations en NaCl supérieures à 400 mM.

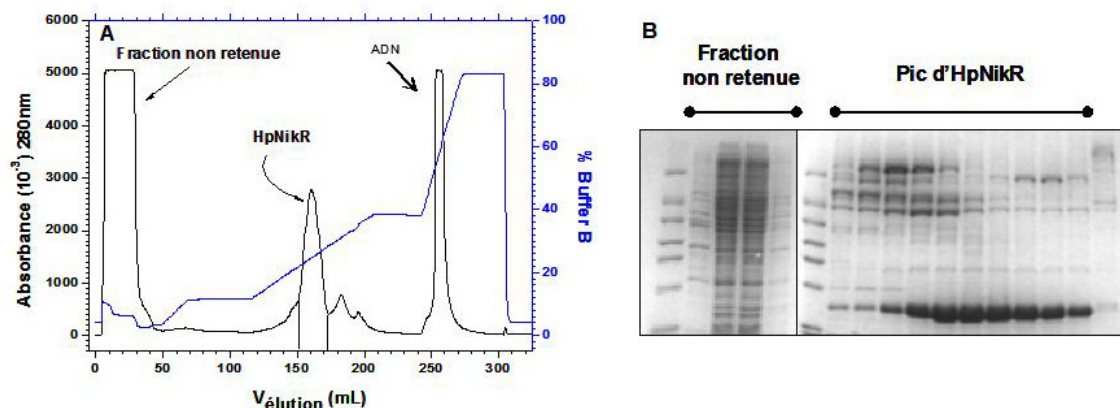


Figure III.2 A) Profil de purification d'HpNikR sur une colonne échangeuse d'anions (Resource Q) où le Tampon d'élution est du 20mM Tris/HCl pH 7,4 1M NaCl. B) Profil de purification des fractions éluées entre 140 et 180 mL visualisé sur SDS-PAGE à 17% en acrylamide.

HpNikR est retenue sur la colonne dans les limites de sa capacité. La protéine, ainsi purifiée, est ensuite concentrée avant de procéder à la seconde étape de purification.

III.2.3. Purification par filtration sur gel

En sortie de colonne échangeuse d'anions, HpNikR est à 70% pure, les 30% d'impuretés restantes sont éliminées par une étape d'exclusion moléculaire. La purification est réalisée sur une colonne Superdex 75 ((16/60) GE Healthcare) qui permet la séparation des protéines en fonction de leur taille.

La [Figure III.3](#) présente le profil d'élution obtenu lors de l'étape d'exclusion moléculaire d'un extrait concentré de la protéine pré-purifiée sur la Resource Q. HpNikR ne présente qu'un seul état oligomérique (pic unique d'élution, [Figure III.4A](#)).

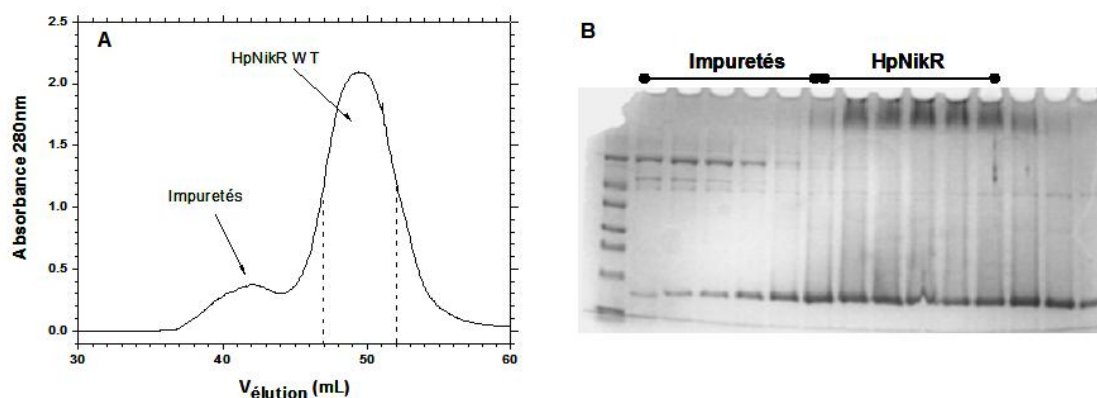


Figure III.3 A) Profil de purification d'HpNikR sur une colonne d'exclusion moléculaire (Superdex 75 préparative), HpNikR est éluée à ~50mL dans un tampon 20 mM Tris/HCl pH 7,4 400mM NaCl 5 mM DTT à 1mL.min⁻¹ à 5°C. B) Gel SDS-PAGE des fractions purifiées sur la colonne d'exclusion moléculaire.

L'analyse par SDS-PAGE montre que la protéine « HpNikR » est pure et présente un poids moléculaire apparent compris entre 14 et 20kDa (Figure III.4B).

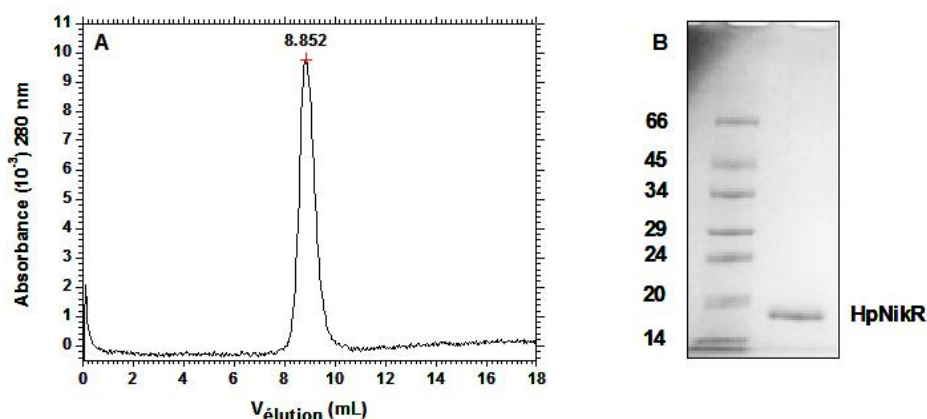


Figure III.4 A) Profil d'HpNikR obtenu sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique Superdex 75 ((10/30) GE Healthcare) dans un tampon 20mM Tris/HCl pH7.4 400mM NaCl. B) Gel SDS-PAGE d'HpNikR purifiée.

Afin de s'assurer de la masse de la protéine, un échantillon a été analysé par spectrométrie de masse. L'analyse faite par D. Lascoux du LSMP de l'IBS Grenoble a montré que le poids moléculaire mesuré était identique au poids moléculaire théorique de 17147 Da.

La protéine purifiée correspond bien à HpNikR WT, cette dernière ne présente pas d'oxydation de type adduit oxygéné ni de pont dissulfure intermoléculaire.

Le contenu métallique d'HpNikR après purification est déterminé par un dosage colorimétrique avec du PAR. Cette dernière contient moins de 5 % de métal en sortie de purification.

Ce protocole de purification est efficace pour l'obtention d'une protéine pure et dépourvue de métal (traces métalliques <5%), en comparaison à un protocole de purification ne comprenant aucun traitement « lourd » à l'EDTA de la protéine et usant en première étape d'une colonne d'affinité chargée en Ni(II). Dans ces conditions, la protéine purifiée peut contenir jusqu'à 50% de nickel (Dian *et al.*, 2006).

50 mg de protéine pure sont obtenus par litre de culture après toutes les étapes de purification.

III.3. Liaison des métaux

Les propriétés de métallation d'HpNikR ont été étudiées au travers de métallations dites « simples » et dites « multiples ». Au cours des métallations « simples », un seul ion métallique est ajouté à la protéine alors qu'au cours des métallations « multiples », plusieurs ions métalliques sont successivement ajoutés. La technique employée afin de mesurer la liaison du Ni(II), du Cu(II) et du Co(II) à HpNikR est la spectroscopie d'absorption électronique (mesure en UV-Visible).

Lorsque ce travail a été initié aucune étude relatant de telles données n'avait été publiée.

III.3.1. Métallation « simple » d'HpNikR

III.3.1.1. Par le Ni(II)

La liaison du nickel par HpNikR dans ses sites métalliques et plus particulièrement dans le site dit de haute affinité peut être suivie en spectroscopie d'absorption UV-visible comme pour EcNikR. Il en résulte des bandes caractéristiques avec d'une part la bande de transfert de charge à 305 nm et une bande d-d à 465 nm (Figure III.5A-B). L'évolution de l'absorbance à 305nm en fonction de l'addition du nickel peut être rapportée afin de mieux visualiser la liaison du métal (Figure III.5C). Une titration comparative de l'effet du Ni(II) sur EcNikR y est ajoutée.

La métallation s'effectue linéairement jusqu'à approximativement 1 équivalent de nickel ajouté par sous unité monomérique de protéine.

Dans ces conditions, il est possible de déterminer le coefficient d'extinction apparent ($\epsilon_{\text{apparent}}$) du complexe Ni-HpNikR en se basant sur la relation de Beer-Lambert. Bien que cette valeur soit caractéristique du complexe, deux epsilons ont toutefois été obtenus sur des lots de protéines purifiées soit en présence de β -mercaptoéthanol ($\epsilon_{\text{apparent}}$ de $5970 \pm 210 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), soit en présence de DTT ($\epsilon_{\text{apparent}}$ de $7740 \pm 300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Bien que ces deux composés soient des réducteurs, le β -mercapthoéthanol, à la différence du DTT, peut former des adduits sur les cystéines (8 par tétramère de protéine). De tels adduits ont d'ailleurs été visualisés lors des études structurales faites par Cyril Dian à l'ESRF Grenoble. La structure d'HpNikR n'a pas été affinée.

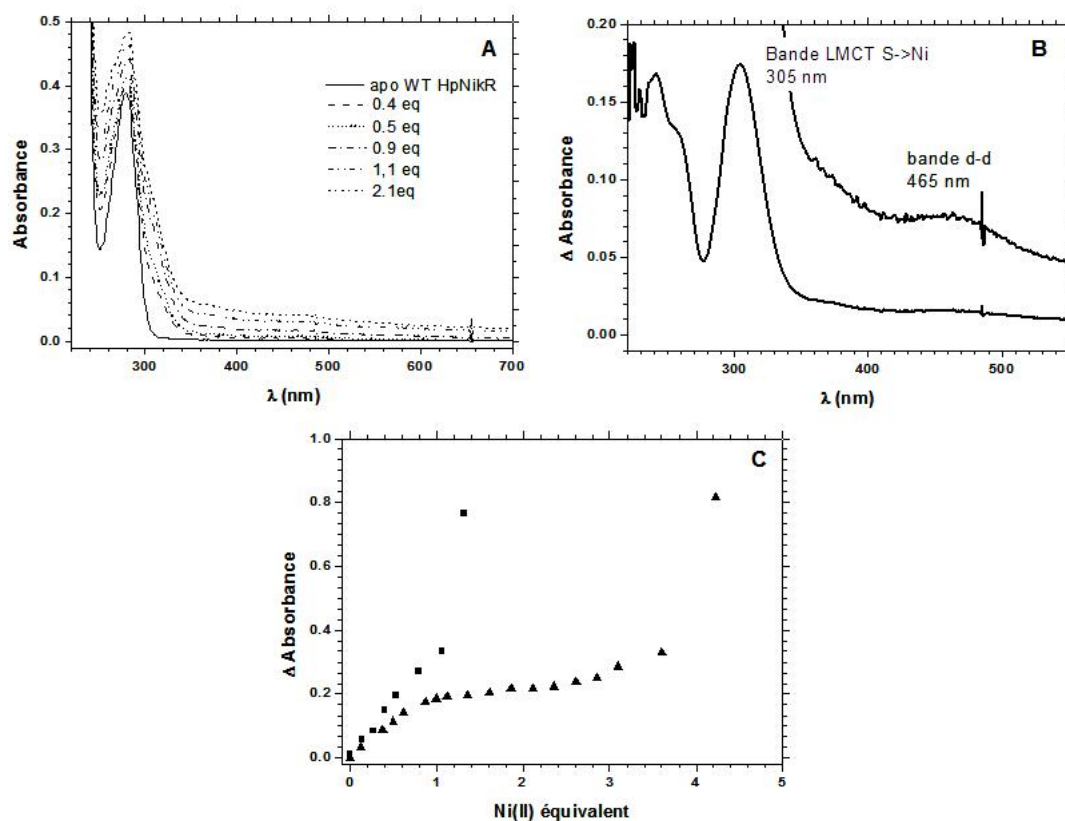


Figure III.5 Métallation d'HpNikR par le nickel. A) Spectres d'absorption UV-Vis de HpNikR à 40 μM à l'état apo et en présence de différents équivalents de nickel. B) Spectre de différence entre Ni-HpNikR (0,9 eq de Ni(II)) et apo-HpNikR. C) Titration d'EcNikR (■) et HpNikR (▲) par le nickel, suivie de l'absorption à 302nm et 305 nm en fonction de la quantité de nickel ajoutée. Conditions : HEPES 20mM pH 8, NaCl 100mM 20°C, Deux sels métalliques ont été testés : NiSO₄ et NiCl₂. Les spectres et les titrations sont identiques.

Dans les deux cas (HpNikR purifiée avec du β-mercaptoéthanol ou avec du DTT), le site métallée d'HpNikR lie jusqu'à 1 équivalent de nickel ajouté par sous unité. La cystéine touchée par de tels adduits n'est pas la cystéine du site de haute affinité mais plutôt la cystéine 96 qui est à proximité de celui-ci.

Après quoi un état de saturation (plateau) est observé. Au delà de 3 équivalents de Ni(II) ajoutés par sous unité, HpNikR précipite dans ces conditions.

Deux hypothèses permettent d'expliquer le « plateau » observé, il rend compte :

- soit de la saturation du premier site, et la précipitation, quant à elle, témoignerait de la métallation d'un ou plusieurs autres sites ayant une moins bonne affinité
- soit de la métallation de site(s) silencieux qui précéderait la précipitation d'HpNikR

HpNikR comprend 3 types de sites de métallations observés lors de la résolution de la structure cristallographique (Dian *et al.*, 2006). La métallation des sites intermédiaires et des sites externes pourraient correspondre à l'état de saturation et/ou de précipitation.

Les propriétés de métallation observées pour HpNikR en comparaison à celle d'EcNikR sont similaires (métallation dans le site dit de haute affinité, précipitation en présence d'un excès de métal) si ce n'est que la précipitation d'HpNikR nécessite plus de Ni(II). Une étude complémentaire sur l'effet du pH sur la métallation d'HpNikR a été réalisée comme pour EcNikR (Figure III.6) (Fauquant *et al.*, 2006). Un effet net du pH sur la précipitation a été noté. En effet HpNikR est moins susceptible de précipiter en présence d'une forte concentration métallique (plus de 20 équivalents de Ni(II)) dans des tampons acidifiés (pH6 à 5,2). Pour des pH < 5, la protéine en absence de métal précipite (dénaturation).

Il est probable qu'HpNikR ne précipite pas *in vivo*, dans la mesure où le pH d'*Helicobacter pylori* tend à être légèrement acidifié (pH 6,9 à 5,8) en fonction du pH du milieu (pH 6,5 à 1-2) dans lequel elle se développe (Stingl *et al.*, 2001).

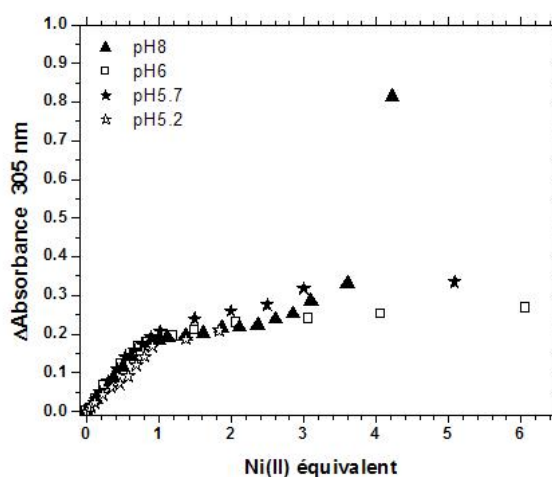


Figure III.6 Titration d'HpNikR par le nickel à différents pH (pH8 (▲) pH6 (□) pH 5,7 (★) et pH5,2 (☆)). Suivie de l'absorption à 305 nm en fonction de la quantité de nickel ajoutée. Conditions : 20mM HEPES pH 8, 100mM NaCl 20°C et 50mM Acétate de sodium pH6 ; 5,7 ou 5,2, 1M NaCl. Sel métallique : Ni(SO)₄.

Les propriétés de métallation observées pour HpNikR sont en partie en accord avec les données décrites dans la littérature (Abraham *et al.*, 2006; Dosanjh *et al.*, 2007). En effet elles ne font allusion qu'à la métallation du site dit de haute affinité avec 1 équivalent de Ni(II) pour lequel l'épsilon à 302nm serait de $6600 \pm 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (protéine traitée avec du DTT) (Abraham *et al.*, 2006). Aucune allusion à la précipitation de la protéine n'est faite.

Par ailleurs, la détermination de la constante de dissociation du site de haute affinité pour le Ni(II) a de nouveau été faite avec une technique indirecte : compétition de liaison du Ni(II) en présence d'EGTA. Ce K_d serait de nouveau de l'ordre du picomolaire (3,5pM) (Abraham *et al.*, 2006) comme pour EcNikR.

Récemment, la constante de dissociation du site de haute affinité d'HpNikR pour le Ni(II) a été « revisitée ». La détermination par un dosage direct (ITC) a été faite, le K_d serait de

l'ordre de la dizaine de nanomolaires et non pas de l'ordre du picomolaire (Zambelli *et al.*, 2007) et de façon intéressante ce K_d évoluerait en fonction du pH. Ces données rejoignent les résultats observés pour EcNikR dans le chapitre II.

III.3.1.2. Par le Cu(II)

La capacité d'HpNikR à lier d'autres métaux que le nickel a été testée, en mesurant entre autre la liaison du Cu(II).

Il résulte de l'addition du cuivre sur HpNikR, l'apparition d'une bande spectrale à 390 nm qui est caractéristique d'un transfert de charge entre le groupement thiolate d'une cystéine et le cuivre (Figure III.7A-B). Cette bande est similaire à celle observée lors de la métallation du site de haute affinité de EcNikR par du Cu(II) (Wang *et al.*, 2004). Ce site chez HpNikR est donc en mesure de lier du cuivre.

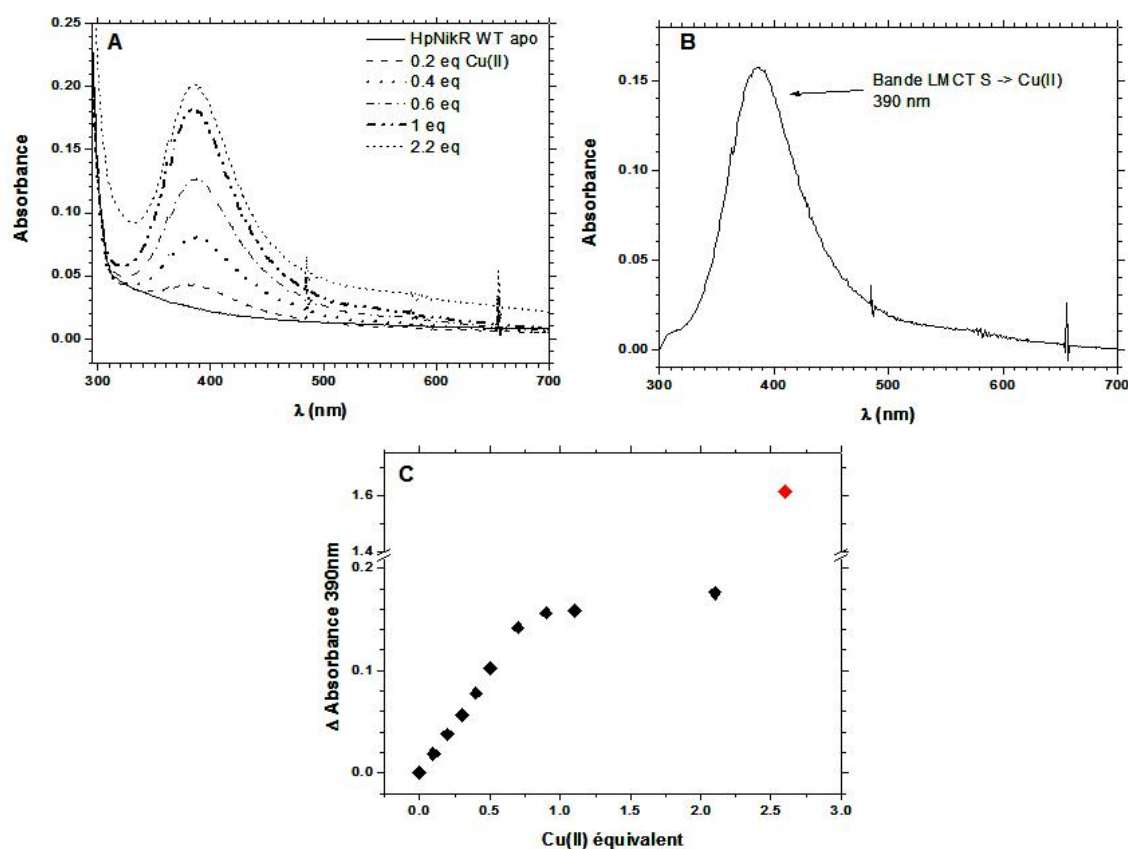


Figure III.7 Métallation d'HpNikR par le cuivre. A) Spectres d'absorption UV-Vis de HpNikR à 63 μM à l'état apo et en présence de différents équivalents de cuivre. B) Spectre de différence entre Cu-HpNikR (1 eq de Cu(II)) et apo-HpNikR. C) Titration d'HpNikR par le cuivre, suivi de l'absorption à 390nm en fonction de la quantité de cuivre ajoutée. Conditions : 20mM HEPES pH 8, 100mM NaCl 20°C. Sel métallique : CuSO₄.

La métallation de ce site s'effectue linéairement jusqu'à approximativement 0,8-0,9 équivalents de cuivre ajouté par sous unité monomérique de protéine (Figure III.7C).

L'épsilon apparent à 390nm est de $3575 \pm 85 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. EcNikR quant à elle est en mesure de lier 1 équivalent de Cu(II) par monomère avec un epsilon à 388nm de $4450 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Après cette métallation, l'état de saturation est observé comme lors de la métallation par le Ni(II) (Figure III.5C). La précipitation est par contre plus précoce, puisqu'elle débute après 2 équivalents. Si la précipitation est liée à la métallation de sites annexes d'HpNikR, soit leur affinité relative pour le cuivre est meilleure que pour le nickel soit les sites sont différents.

III.3.1.3. Par le Co(II)

III.3.1.3.1. Intérêt de l'ion métallique Co(II) : sonde spectroscopique

Métalliser une protéine avec du cobalt présente un intérêt certain, cela permet d'étudier, de caractériser des sites métalliques silencieux à certains métaux comme le Zn(II) en spectroscopie d'absorption UV-Visible. L'ion Co(II) (structure électronique : $3d^7$) est une bonne sonde spectroscopique. Il peut former des complexes soit de bas (1/2) soit de haut (3/2) spins dont les propriétés diffèrent. Généralement ce sont plutôt des complexes de haut spin qui sont formés.

Deux types d'informations concernant l'environnement du métal sont extraites des mesures en spectroscopie d'absorption électronique de protéines métallées au Co(II) (Maret & Vallee, 1993) :

- La géométrie du site : distinction entre les géométries de type octaédrique et tétraédrique en considérant l'intensité (coefficient d'extinction molaire) des bandes d-d situées entre 400 et 800nm.

Les corrélations empiriques suivantes ont été établies (Banci *et al.*, 1982):

$$\epsilon < 50 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1} \text{ pour une coordination } 6$$

$$50 < \epsilon < 300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1} \text{ pour une coordination } 5$$

$$\epsilon > 300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1} \text{ pour une coordination } 4$$

- La présence ou non de cystéine dans la sphère de coordination et le nombre de résidus impliqué dans le site en observant la présence ou non d'une bande intense qui correspond à un transfert de charge situé entre 300 et 400 nm ($900 < \epsilon < 1300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour une cystéine dans la sphère de coordination (Vasak *et al.*, 1981)). Des bandes de transferts de charge entre l'azote, l'oxygène et le cobalt existent également mais le maximum d'absorption est dans une gamme de longueur d'ondes généralement inférieure à 300 nm.

III.3.1.3.2. Suivre par spectroscopie d'absorption électronique

La métallation d'HpNikR par du Co(II) a également été réalisée. Il en résulte l'apparition de bandes spectrales caractéristiques à 309, 370, 545, 585 et 630 nm (Figure III.8A-B). Les bandes à 309 et 370nm de fortes intensités ($\epsilon_{309\text{nm}}$ moyen: $1084 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{370\text{nm}}$ moyen : $525 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) sont la signature d'un transfert de charge entre un thiol et le Co(II). L'intensité de la bande à 309 nm indique que le site de métallation implique une cystéine dans la coordination de l'ion métallique.

Ces bandes à 309 et 370 nm sont similaires à celles observées lors de la métallation du site de haute affinité d'EcNikR par du Co(II) (Wang *et al.*, 2004). Ce site chez HpNikR est donc en mesure de lier du cobalt. La métallation de ce site s'effectue linéairement jusqu'à approximativement 1-1,2 équivalents de cobalt ajoutés par monomère de protéine (Figure III.8C). Après quoi un état de saturation est observé. La précipitation « massive » de la protéine n'est pas observée même à 4 équivalents de Co(II) par sous unité monomérique.

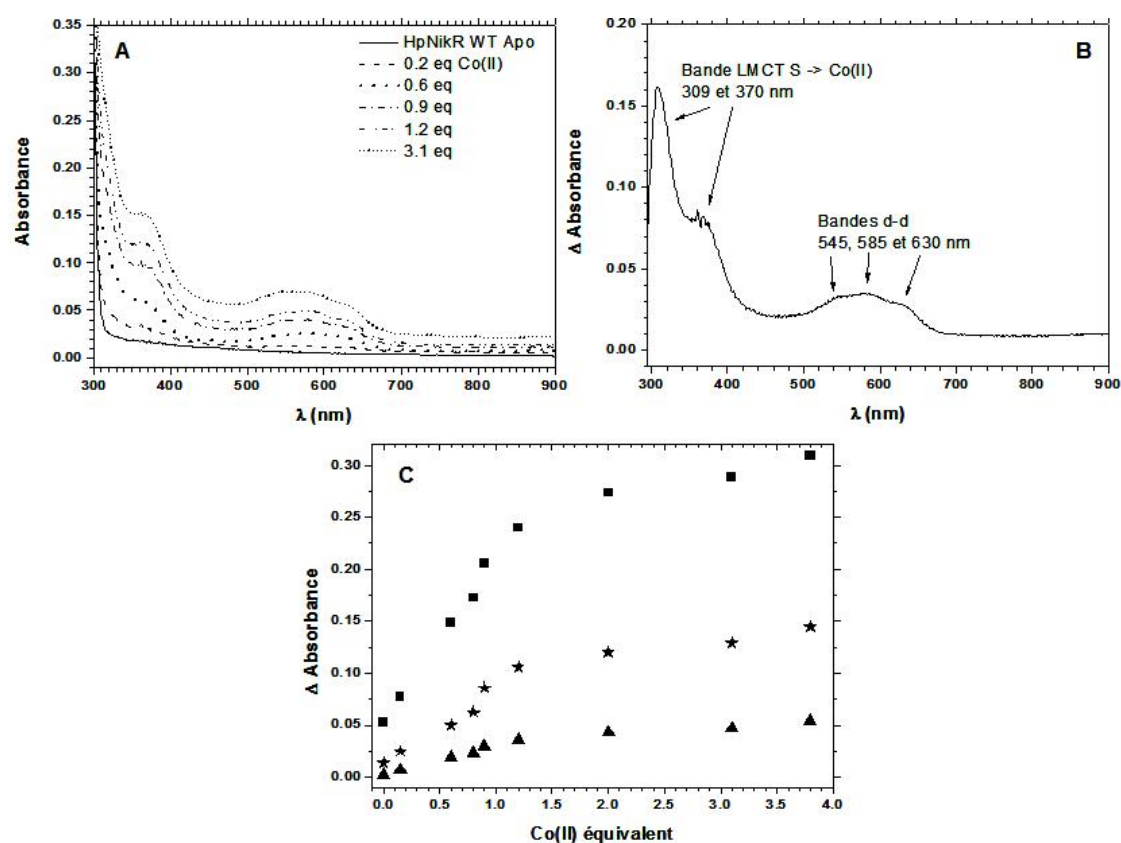


Figure III.8 Métallation d'HpNikR par le cobalt. A) Spectres d'absorption UV-Vis de HpNikR à $196\mu\text{M}$ à l'état apo et en présence de différents équivalents de cobalt. B) Spectre de différence entre Co-HpNikR (1,2 eq de Co(II)) et apo-HpNikR. C) Titration d'HpNikR par le cobalt, suivie de l'absorption à 309nm (■), 370nm (★) et 585nm (▲) en fonction de la quantité de cobalt ajoutée. Les données ont été corrigées par soustraction de l'absorbance à 800nm. Conditions : 20mM MOPS pH 7, 40mM KCl 20°C. Sel métallique : CoSO_4 . Des titrations identiques sont observées dans un tampon 20mM HEPES pH 8, 100mM NaCl.

Les bandes à 545, 585 et 630nm dont les intensités croissent durant la métallation du site de haute affinité, sont des bandes d-d qui renseignent sur la géométrie du site en cours de métallation. L'intensité des bandes est faible, le coefficient d'extinction molaire apparent de la bande à 585 nm est de $196 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Cette intensité laisse envisager que le site métallé serait plutôt pentacoordonné et non pas tétracoordonné. Ces données suggèrent que HpNikR lie du Co(II) dans un site dit de haute affinité modifié qui comprendrait 5 ligands dont une cystéine. Le site pourrait présenter une géométrie de type pyramidal à base carrée. Un ligand axial couplé aux ligands impliqués nativement dans le site permettrait l'obtention d'une telle géométrie.

Ce site est saturable par 1 équivalent de métal ajouté.

L'état de saturation observé, après métallation du site de haute affinité, n'est qu'apparent. En effet, au-delà de 1 équivalent on peut noter que la bande à 545 nm gagne en intensité en comparaison à celle à 585nm (Figure III.9). L'intensité de cette bande a été mesurée en fonction de la quantité de cobalt ajoutée, le coefficient d'extinction molaire apparent est de $59 \pm 10 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Dans ces conditions HpNikR serait capable de métaller un second site métallique dépourvu de cystéine qui présenterait une géométrie hexa ou pentacoordonnée. HpNikR pourrait également lier du nickel et du cuivre dans ce site. Cette liaison pourrait se traduire par la phase de saturation observée au cours de la métallation.

Ce site serait « silencieux » au Ni(II) et au Cu(II) en UV-Visible. Après sa métallation par l'un de ces deux métaux, HpNikR précipiterait. Un troisième site pourrait être métallé.

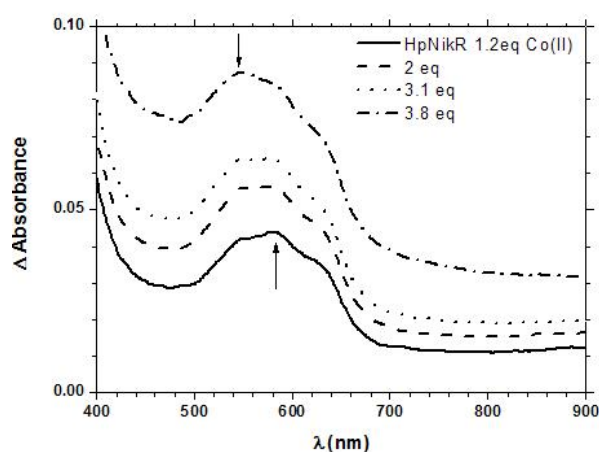


Figure III.9 Métallation d'HpNikR par le cobalt au-delà de 1.2 équivalents ajoutés. Spectre de différence entre Co-HpNikR (X eq de Co(II)) et apo-HpNikR. Conditions : 20mM MOPS pH 7, 40mM KCl 20°C.

III.3.2. Métallation « multiple » d'HpNikR

L'avantage de faire des métallations multiples est d'observer si le second métal ajouté :

- s'additionne au premier (apparition d'une nouvelle bande spectrale sans perte des premières signatures)
- n'a aucun effet (aucune métallation ou métallation silencieuse en UV-Vis)
- ou au contraire se substitue au premier métal (apparition des nouvelles bandes spectrales et perte des premières signatures)

Cela apporte des informations sur les affinités relatives de la protéine pour les métaux, mais aussi sur l'accessibilité des sites, et donc des éventuels changements structuraux (changement de la géométrie des sites). Avant de réaliser ces métallations, il faut s'assurer du comportement de la protéine face au métal dit 2, lorsque celui-ci est ajouté en premier. Le métal dit 2, dans ces expériences, était le Ni(II). Dans les conditions expérimentales appliquées, HpNikR liait 0,9 équivalent de Ni(II) dans le site de haute affinité avec un coefficient d'extinction molaire de $7490 \pm 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cette mesure sert de référence pour le système.

III.3.2.1. Par le Co(II) suivi du Ni(II)

Une première double métallation a été réalisée, avec du Co(II) et du Ni(II) comme premier et second métal respectivement. Deux équivalents de Co(II) ont été ajoutés à HpNikR. La métallation du site de haute affinité a été observée avec l'apparition des bandes à 309, 370 et 585nm (Figure III.10). La métallation du second site a également été notée à 545nm.

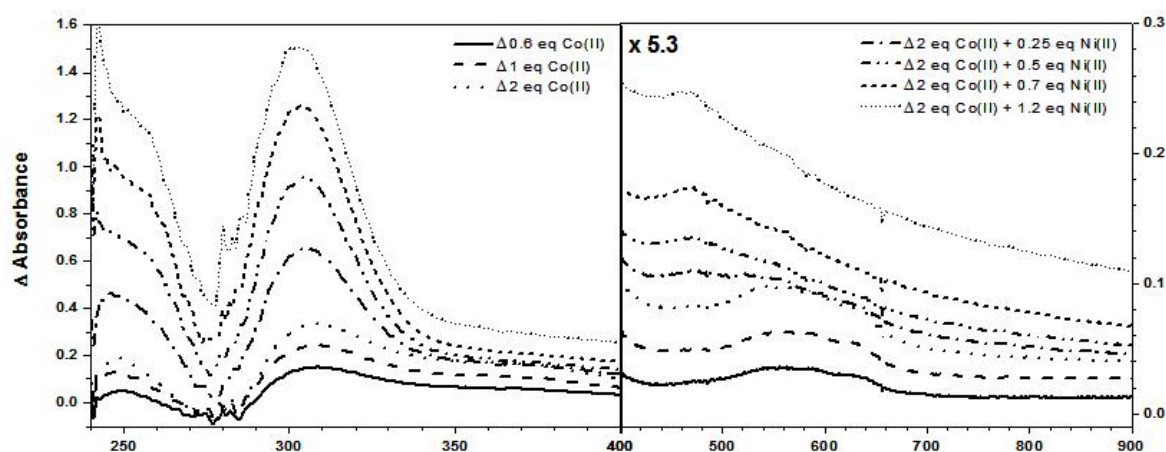


Figure III.10 Métallation d'HpNikR 205μM par le Co(II) puis par le Ni(II). Spectres de différence entre Métal-HpNikR (X eq de métal) et apo-HpNikR. Conditions : 20mM MOPS pH 7, 40mM KCl 20°C.

HpNikR lie 1 équivalent de cobalt dans le site de haute affinité qui comprend une géométrie pentacoordonnée ($\epsilon_{585\text{nm}} : 224 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) avec une cystéine comme ligand ($\epsilon_{309\text{nm}} : 1193 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{370\text{nm}} : 491 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Figure III.11A).

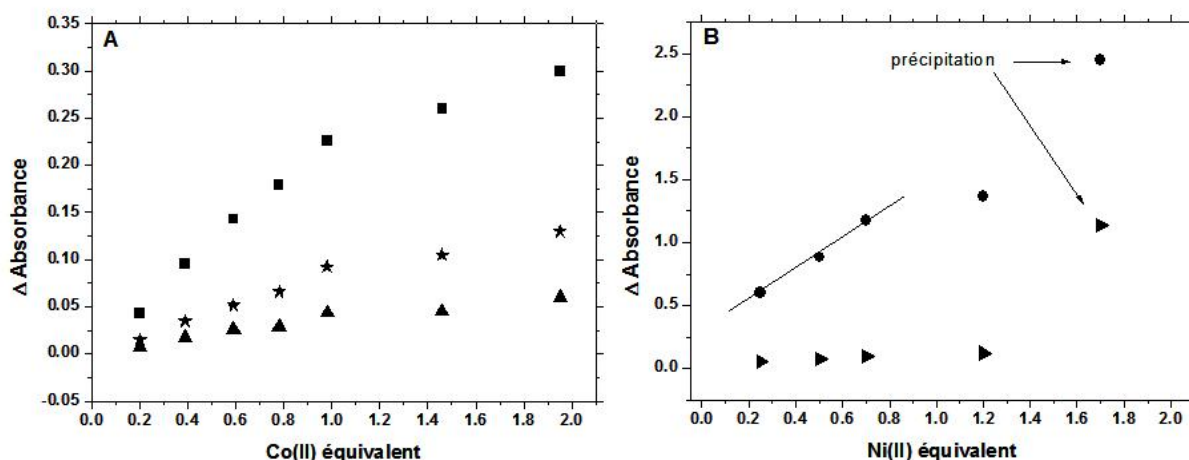


Figure III.11 Titration d'HpNikR par le cobalt puis par le nickel. A) Titration d'HpNikR par le cobalt, suivi de l'absorption à 309nm (■), 370nm (★) et 585nm (▲) en fonction de la quantité de cobalt ajoutée. B) Titration de Co-HpNikR par le nickel, suivi de l'absorption à 305nm (●), 465nm (►) en fonction de la quantité de nickel ajoutée. Les données ont été corrigées par soustraction de l'absorbance à 800nm. L'effet de dilution de la concentration de la protéine a été pris en compte ([C] ayant varié de 205 à 181 μM). Conditions : 20mM MOPS pH 7, 40mM KCl 20°C.

L'addition du Ni(II) sur HpNikR après le Co(II) s'est traduite par l'apparition des bandes à 305 et à 465 nm (Figure III.10). L'apparition de ces bandes est concomitante à la disparition des bandes dues à la métallation par le Co(II). HpNikR a lié 0,8 équivalent de nickel dans le site de haute affinité ($\epsilon_{305\text{nm}} : 6910 \pm 490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Figure III.11B) avant saturation puis précipitation au-delà de 1,2 équivalents de Ni(II) soit au-delà de 3,2 équivalents de métal.

Ces données suggèrent que le Ni(II) se substitue au Co(II) dans le site de haute affinité. Ce site est plus affiné pour le Ni(II) que pour le Co(II). La protéine est capable de précipiter en présence de 2 équivalents de Co(II) et de 1,2 équivalents de Ni(II). HpNikR doublement métallée présente les mêmes propriétés d'agrégation que la protéine métallée uniquement par du Ni(II). En présence uniquement de Co(II), HpNikR ne précipite pas même à 4 équivalents de Co(II). Ceci laisse suggérer que la liaison du nickel dans le site de haute affinité, contrairement à celle du Co(II) dans le même site, pourrait induire des changements de conformations qui favoriseraient la liaison de métal supplémentaire dans des sites capables d'induire la précipitation. Une seconde hypothèse peut être envisagée. L'excès de Ni(II) se lierait directement dans les sites d'agrégation sans impliquer des changements conformationnels. La double métallation inverse a été réalisée.

III.3.2.2. Par le Ni(II) suivi du Co(II)

1,1 équivalents de Ni(II) ont été additionnés à HpNikR afin de saturer son site de haute affinité. Puis 1 équivalent de cobalt a été ajouté à la protéine. Aucune bande à 585 nm n'est apparue. Ceci confirme le fait que le Co(II) ne peut se substituer au Ni(II) dans le site de haute affinité. Par contre la conformation imposée par la métallation du site de haute affinité par le Ni(II), n'empêche pas la métallation d'un site 2 modifié par le cobalt (épaulement à 555 nm, ($\epsilon_{555\text{nm}}$: $89 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)). Ce site aurait une géométrie hexa ou pentacoordonnée.

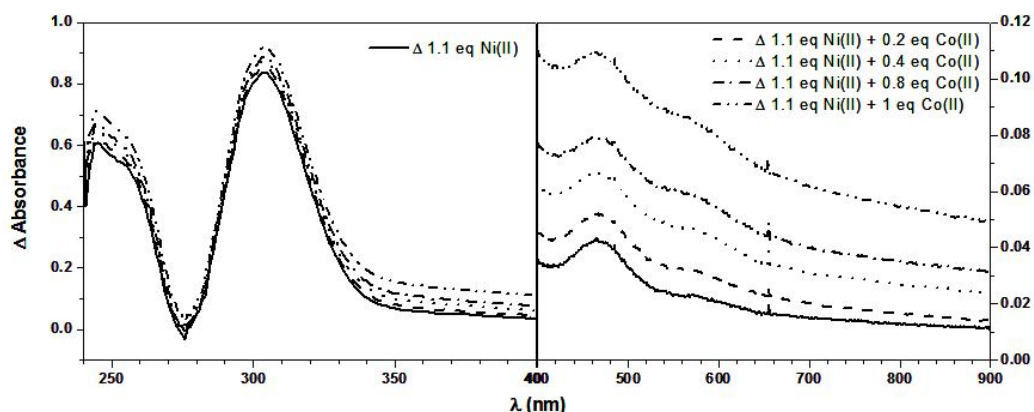


Figure III.12 Métallation d'HpNikR $173 \mu\text{M}$ par le nickel puis par le cobalt. Spectres de différence entre Métal-HpNikR (X eq de métal) et apo-HpNikR. Conditions : 20mM MOPS pH 7, 40mM KCl 20°C .

III.3.2.3. Par le Mn(II) suivi du Ni(II)

Une troisième double métallation a été réalisée, avec du Mn(II) et du Ni(II) comme premier et second métal respectivement. Deux équivalents de Mn(II) ont été ajoutés à HpNikR. La métallation du site de haute affinité ou d'un autre site si elle a lieu n'a pas de signature spectrale notable (Figure III.13A). Des mesures de RPE à température ambiante pourraient nous donner cette information.

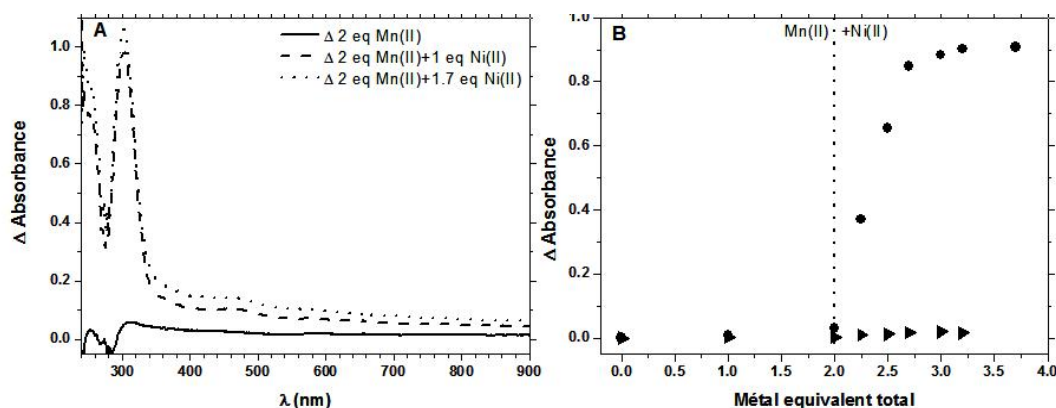


Figure III.13 Métallation d'HpNikR $205 \mu\text{M}$ par le Mn(II) puis par le Ni(II). A) Spectres de différence entre Métal-HpNikR (X eq de métal) et apo-HpNikR. B) Titration d'HpNikR par le nickel, suivi de l'absorption à 305nm (●), à 465nm (►) en fonction de la quantité de nickel ajoutée. Les données ont été corrigées par soustraction de l'absorbance à 800nm. Conditions : 20mM MOPS pH 7, 40mM KCl 20°C . Sels métalliques : MnCl_2 et NiCl_2 .

L'addition du Ni(II) est corrélée à l'apparition des bandes à 305 et à 465 nm. Le site de haute affinité est saturé avec 0,7 équivalents de Ni(II) ajoutés par monomère et le coefficient d'extinction molaire apparent est de $5770 \pm 480 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le Ni(II) est capable de se substituer au Mn(II) en supposant que ce dernier se lie dans le site de haute affinité. Son affinité est donc plus grande pour le Ni(II). Cette substitution semble totale. Cependant l'épsilon mesuré est plus faible que pour une métallation directe par du nickel ($\epsilon_{\text{app}} : 7490 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). L'addition de Mn(II) aurait perturbé la métallation du site de haute affinité par le Ni(II). De plus, à plus de 3,5 équivalents de métal total, la protéine ne précipite pas. L'addition de Mn(II) puis de Ni(II) en comparaison à l'addition de Co(II) puis de Ni(II) ne conduit pas à un même comportement. Les sites secondaires et tertiaires (associés à l'agrégation) ne lieraient pas de Mn(II) ou présenteraient une affinité moins bonne pour ce métal.

Différentes hypothèses permettraient d'expliquer le comportement de métallation observé :

- Le Mn(II) a pu lier un site de haute affinité modifiée (géométrie différente : possiblement octaédrique ?). Bien que la substitution par le Ni(II) paraisse totale, l'épsilon est diminué. Il pourrait refléter une double métallation concomitante, avec la métallation de deux sites de haute affinité par la Ni(II) et la métallation de deux sites silencieux par du Ni(II) ou par du Mn(II) comme les sites intermédiaires.
- Le Mn(II) a peut-être été lié dans des sites métalliques autres que le site de haute affinité ayant induit des changements conformationnels. Ceci n'empêcherait pas la métallation du site de haute affinité par le Ni(II) mais pourrait éventuellement modifier sa géométrie et donc son affinité. L'épsilon pourrait en être affecté.

Un epsilon de cet ordre ($5770 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) pour la bande à 305nm a été auparavant observé pour des lots de protéines ayant été purifiés avec du β -mercapthoéthanol ($5970 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Ce dernier peut former des adduits avec les cystéines et donc perturber l'environnement du site de haute affinité. 4 cystéines du tétramère sont impliquées dans la coordination du Ni(II) dans le site de haute affinité et les 4 autres cystéines (C96) sont à proximité de ce site. Le Mn(II) aurait donc perturbé l'environnement du site de haute affinité. HpNikR serait donc bien en mesure de lier du Mn(II) dans l'environnement du site de haute affinité et sa liaison modifierait la liaison du Ni(II) dans le site de haute affinité.

III.4. Effets des métaux sur la conformation

Deux techniques ont été employées afin d'observer les effets des métaux sur les changements conformationnels d'HpNikR responsables de l'activation de la protéine pour sa liaison à l'ADN.

III.4.1. Effets des métaux suivis par la fluorescence du tryptophane

Cette technique renseigne sur l'environnement du tryptophane. En fonction de la longueur d'onde maximale d'émission, on peut évaluer si le tryptophane est enfoui dans la protéine (λ_{max} vers 310 nm) ou exposé au solvant (λ_{max} vers 350 nm).

HpNikR comprend 1 tryptophane par unité monomérique (W54), qui est situé à la fin de l'hélice $\alpha 2$ du domaine de liaison à l'ADN ([Figure III.14](#)). Les changements de conformation de la protéine induits par la métallation pourraient se refléter au travers d'une évolution du λ_{max} d'émission du tryptophane qui traduirait des changements d'environnement de ce dernier.

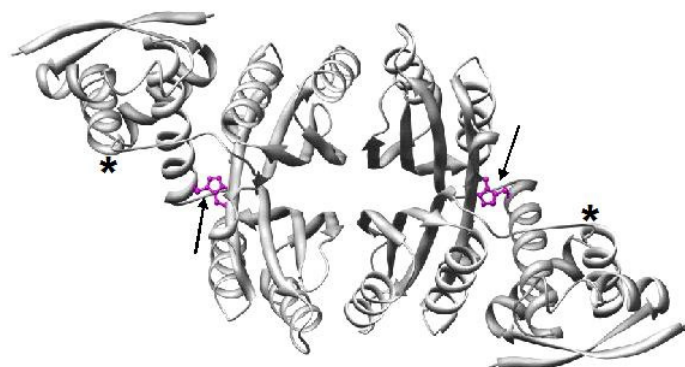


Figure III.14 Structure tridimensionnelle d'HpNikR sur laquelle ont été indiqués les tryptophanes. Les deux tryptophanes visualisés dans la structure sont précisés par les deux flèches. L'emplacement des deux tryptophanes non observés est précisé par les astérisques.

III.4.1.1. Fluorescence d'HpNikR apo

Le spectre d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpNikR apo à 3 μ M, enregistré dans du tampon MOPS 20mM pH7 KCl 150mM, montre que ce dernier est partiellement exposé au solvant puisque la λ_{max} d'émission est de 341 nm ([Figure III.15](#)).

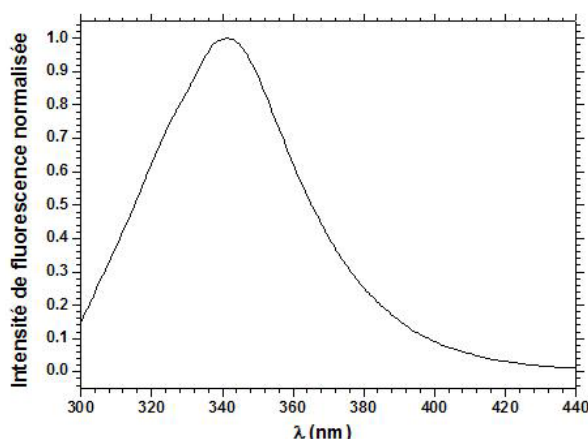


Figure III.15 Spectre d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpNikR apo à 3 μ M enregistré dans du tampon 20mM MOPS pH7 150mM KCl à 25°C après excitation à 295 nm_cut off à 290nm.

Ceci diffère légèrement du λ_{max} de la protéine proposé par Dosanjh et al. et qui est de 338nm (Dosanjh *et al.*, 2007). Cette variation pourrait venir du fait que l'excitation est faite à 280 nm au lieu de 295 nm. La longueur maximale d'excitation des tryptophanes est à 280 nm mais est proche de celle des tyrosines à 275 nm. C'est pourquoi l'excitation dans notre étude est faite à 295nm associée à un filtre à 290nm. La contribution dans le spectre d'émission des tyrosines (3 par monomère) est donc faible.

III.4.1.2. Fluorescence d'HpNikR métallée

L'effet des métaux sur la fluorescence du tryptophane a ensuite été observé (Figure III.16). Les spectres ont été enregistrés sur HpNikR apo à l'équilibre et en présence de différents équivalents de métal qui ont été ajoutés progressivement dans l'échantillon.

L'addition des métaux sur HpNikR ne modifie pas la longueur d'onde maximale d'émission du tryptophane. L'environnement de ce dernier ne semble pas modifié. Toutefois on peut constater que l'addition des métaux provoque un « quench » de l'intensité de la fluorescence du tryptophane variable selon le métal considéré.

Pour le Ni(II) et le Cu(II), le quench semble être maximal à partir de 1 équivalent de métal ajouté par monomère. Ce quench semble corrélé à la métallation du site de haute affinité d'HpNikR par ces métaux. Pour le Co(II), le quench n'est pas aussi intense ; il est même inexistant pour le Mn(II) (non montré).

L'absence de quench pourrait refléter soit l'absence de liaison du Mn(II) dans le site de haute affinité soit une moins bonne affinité de ce site pour ce métal si l'on considère que le quench et la métallation du site de haute affinité sont corrélés.

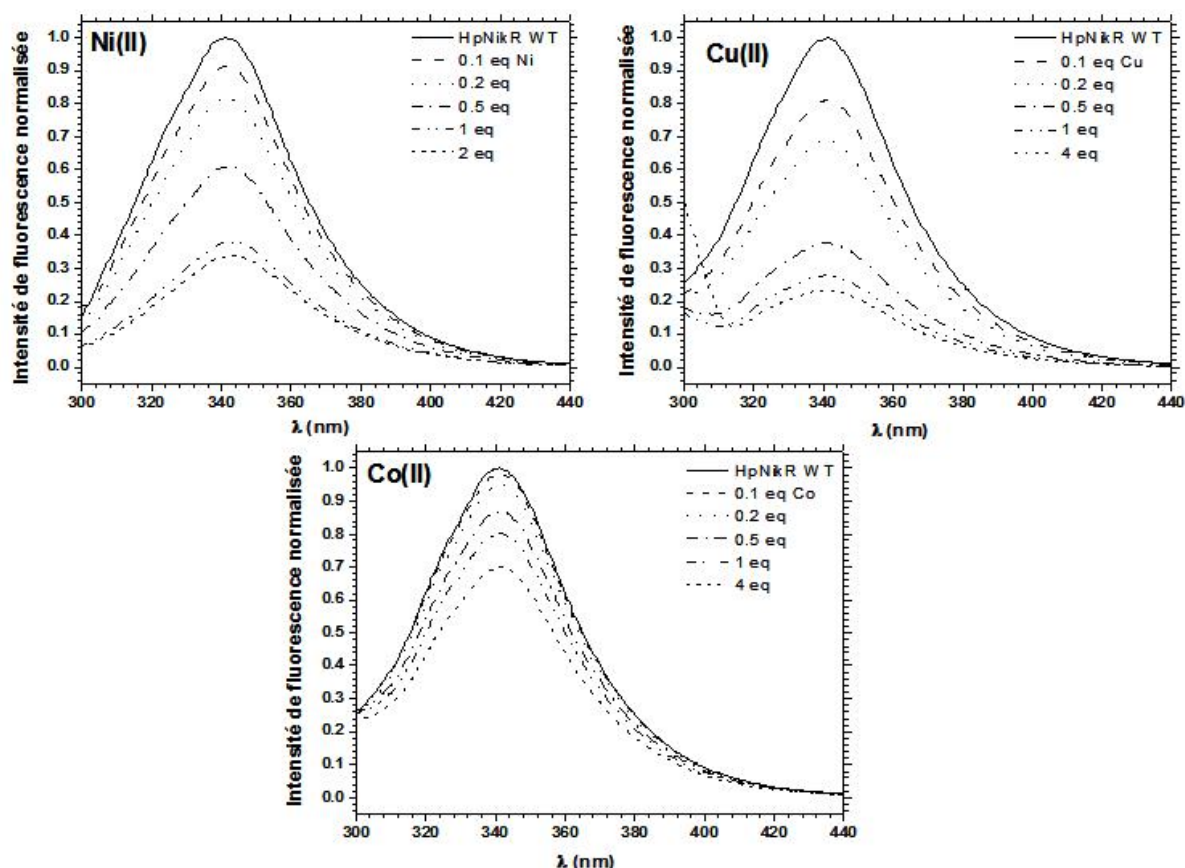


Figure III.16 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpNikR apo (2,5 ; 3 et 5 μM) et en présence de différents métaux (Ni/Cu/Co) enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7 150mM KCl à 25°C après équilibration et après excitation à 295 nm _ cut-off à 290nm. Sels métalliques : NiSO₄, CuSO₄ et CoSO₄.

Les métaux de transitions sont connus comme étant de bons quenchers de la fluorescence (Rupcich *et al.*, 2006). Ce quench a lieu selon différents mécanismes parmi lesquels les phénomènes de transfert de charge, les transferts d'énergie *via* les électrons et le transfert d'énergie *via* du FRET (Förster Resonance Energie Transfer). Ce dernier mécanisme implique une proximité spatiale ainsi qu'un chevauchement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

Ces mécanismes pourraient expliquer le quench observé dans la limite d'une proximité spatiale entre le tryptophane et le métal lié. HpNikR peut lier du nickel dans au minimum trois sites qui sont à 31, 28 et 36 Å des tryptophanes pour le site de haute affinité, le site intermédiaire et le site externe respectivement. Seule la liaison du premier équivalent du nickel par HpNikR induit ce quench. Ils sont donc corrélés. D'autres part seuls le Ni(II), le Cu(II) et le Co(II) ont une signature en spectroscopie électronique et ces spectres d'absorption chevauchent en partie le spectre d'émission de fluorescence du tryptophane. Ces données confirment le fait que le quench observé est dépendant de la métallation du site de haute affinité.

Dans ces conditions, il est possible de déterminer l'affinité apparente de la protéine pour les métaux en rapportant l'évolution du quench en fonction de la quantité de métal ajoutée (Figure III.17) (Chou *et al.*, 2004; Dunning Hotopp *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 1995).

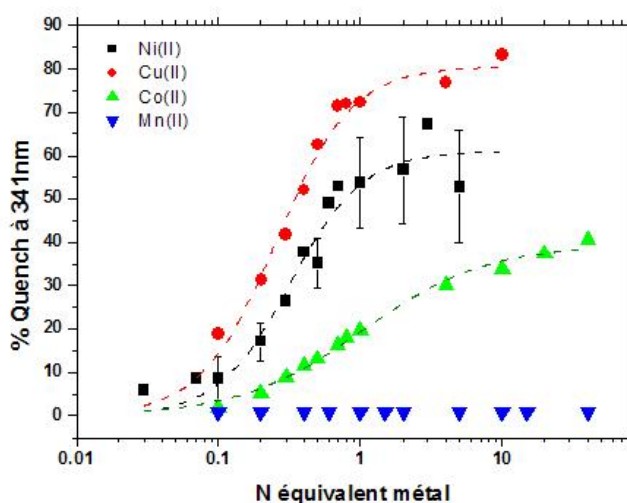


Figure III.17 Evolution du quench de la fluorescence du tryptophane d'HpNikR (2.5 μ M pour les expériences avec le cuivre et le cobalt et 3 μ M pour les autres métaux) à 341nm (λ_{max} d'émission) en fonction du nombre d'équivalents de métal ajoutés par unité monomérique de protéine. Ni(II) ■, Cu(II) ●, Co(II) ▲ et le Mn(II) ▼. Des ajustements ont été réalisés pour chaque série expérimentale, pour les données du Ni(II) et du Cu(II), seul un modèle complexe permet de les ajuster, pour les données du Co(II) un modèle simple 1 métal pour 1 monomère permet l'ajustement.

Afin de déterminer le K_d de liaison des métaux, des modèles d'ajustement[‡] ont été testés. Un premier modèle simple, reposant sur l'hypothèse qu'HpNikR lie 1 ion métallique par sous unité monomérique ou plus précisément dans le site de haute affinité, a été testé. Ce modèle a permis d'ajuster les données obtenues uniquement avec le Co(II), et le K_d apparent est de $2,5 \pm 0,18 \mu\text{M}$. Afin d'ajuster les données obtenues avec le Cu(II) et le Ni(II), le modèle de Hill a été utilisé. Le K_d apparent pour le Cu(II) serait de $0,65 \pm 0,05 \mu\text{M}$ et celui pour le Ni(II) serait de $0,9 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Dans les deux cas, le coefficient de Hill est supérieur à 1 ($n = 1,6$ et $1,7 \pm 0,3$ respectivement). Ces coefficients peuvent témoigner d'une coopérativité positive mise en jeu lors de la métallation des sites de haute affinité de la protéine. Les sites métallés pourraient ne pas être équivalents. La métallation d'un ou deux sites de haute affinité pourraient induire des changements conformationnels facilitant la métallation des autres sites de haute affinité. La métallation par le cobalt ne semble pas impliquer de mécanisme de coopérativité. Les sites métallés au Co(II) seraient alors tous équivalents.

[‡] Les modèles d'ajustement sont présentés en annexe B.

Le fait de ne pas observer de changement d'environnement du tryptophane n'est pas si surprenant. En effet quelques soient les modifications conformationnelles engendrées par le métal sur le domaine de tétramérisation et sur les domaines de liaison à l'ADN (bascullement en cis ou en trans des domaines de liaison à l'ADN), les tryptophanes conservent toujours le même environnement moyen (Figure III.18).

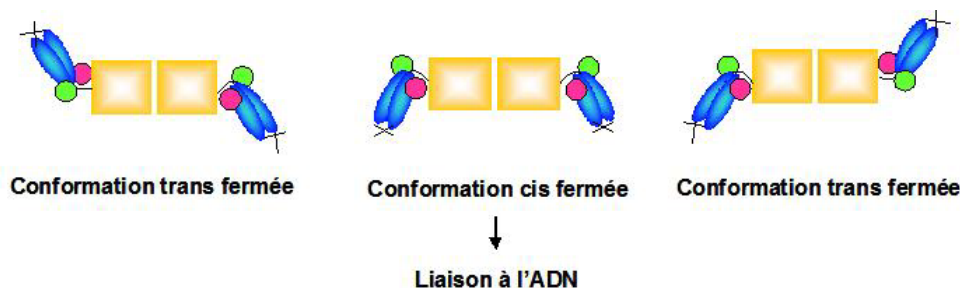


Figure III.18 Schéma du positionnement moyen des tryptophanes dans la structure d'HpNikR en fonction du basculement des domaines de liaison à l'ADN. ● et ● : tryptophane 54 dans des environnements légèrement différents.

Une seconde technique a été employée afin de mesurer des changements conformationnels globaux de la protéine en cours de métallation.

III.4.2. Effets du nickel suivis avec la fluorescence de l'ANS

Cette technique rend compte de l'accessibilité des régions hydrophobes de la protéine et de ce fait d'éventuels changements induits par la liaison d'un ligand comme le Ni(II).

Lorsque le 8-anilino-1-naphtalène sulfonate (ANS) est mis en présence de protéine, il se lie aux régions hydrophobes exposées. Cette liaison entraîne une modification de la fluorescence moyenne de l'ANS. Sur un spectre d'émission, cette liaison est identifiable avec un déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de l'ANS ainsi qu'avec une augmentation de l'intensité. Un tel comportement a été observé lors de la mise en présence d'HpNikR avec 50 μ M d'ANS (Figure III.19A). Certaines régions hydrophobes d'HpNikR sont donc accessibles à l'ANS. L'addition de Ni(II) provoque une modification de la fluorescence de l'ANS associée à HpNikR avec une perte d'intensité ainsi qu'un déplacement « inverse ». Il est à noter que le Ni(II), en absence de protéine, n'a aucun effet sur la fluorescence de l'ANS. Le Ni(II) induit donc des changements conformationnels de la protéine rendant moins accessible ses régions hydrophobes à l'ANS.

L'évolution de ces changements a été représentée sur la Figure III.19B. L'addition de 0,25 équivalent de métal suffit à provoquer 50% des changements conformationnels. Un peu plus de 75% des changements conformationnels est permis par 0,5 équivalent de Ni(II).

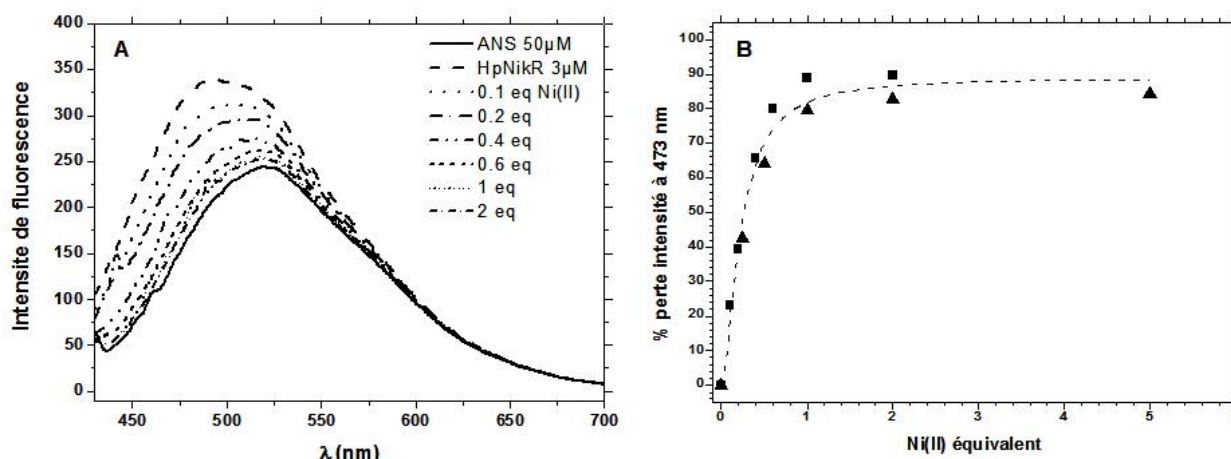


Figure III.19 Effet du Ni(II) sur la conformation d'HpNikR mesuré par le suivi de la fluorescence de l'ANS. A) Spectres d'émission de l'ANS seul et en présence d'HpNikR (3 μ M) avec différents ajouts de Ni(II) mesuré dans du 20mM MOPS pH7, 150mM KCl à 25°C après excitation à 370nm _ cut-off à 390nm. B) % perte d'intensité de la fluorescence de l'ANS à 473 nm en fonction du nombre d'équivalents de Ni(II) ajouté par unité monomérique de protéine (HpNikR à 3 μ M ■ et à 5 μ M ▲).

Le premier site métallé est le site de haute affinité. HpNikR possède 4 sites de haute affinité par tétramère. D'après l'étude portant sur la fluorescence du tryptophane, ces sites ne seraient pas équivalents. Le suivi de fluorescence de l'ANS en fonction de la quantité de Ni(II) présent montre que la liaison de 2 Ni(II) par tétramère suffirait à engendrer plus de 75% des changements conformationnels de la protéine. La liaison de ces deux nickels pourrait faciliter la liaison des deux autres nickels par tétramère et donc faciliter *in fine* l'activation d'HpNikR pour la liaison à l'ADN.

Des premiers essais ont montré que la liaison du Cu(II) et du Co(II) par HpNikR rendaient également moins accessibles les zones hydrophobes à l'ANS à pH7 (Figure III.20). Il n'en serait pas de même pour le Mn(II), à moins que l'affinité de l'ANS pour HpNikR ($K_{d\text{apparent}} \sim 10\text{-}20\mu\text{M}$) soit supérieure à celle de cette dernière pour le Mn(II).

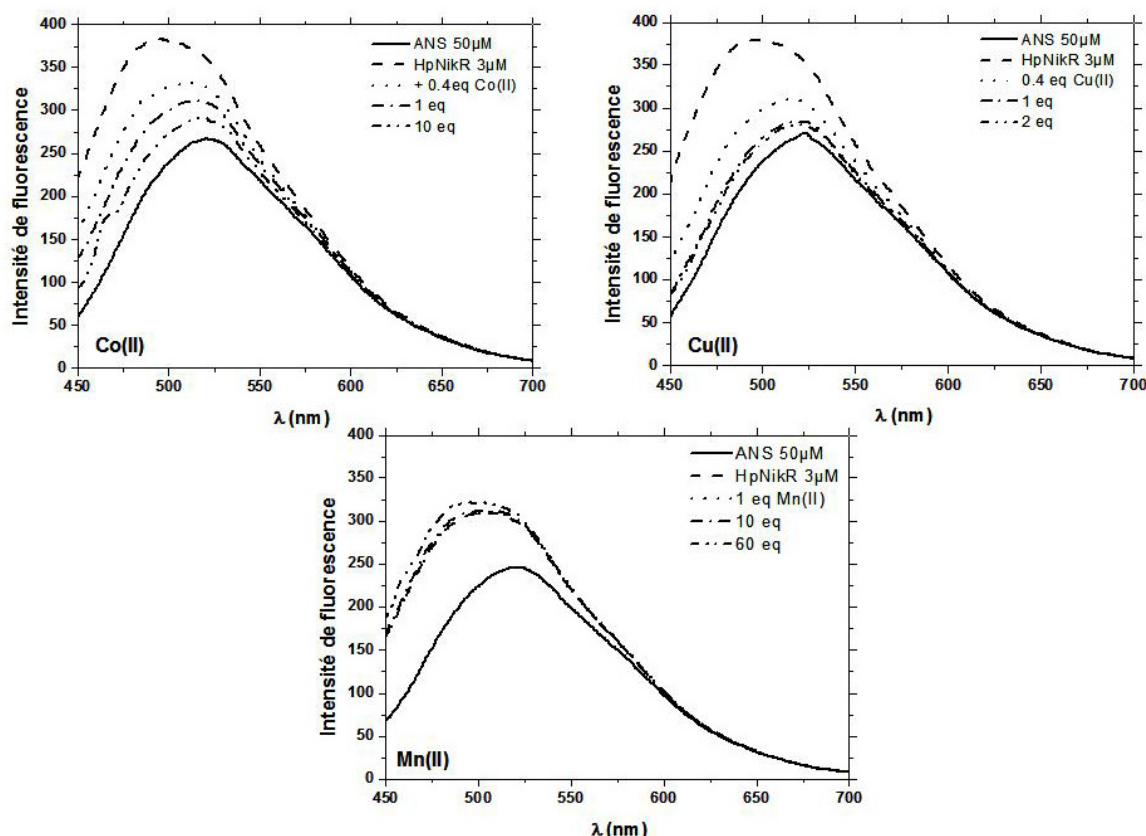


Figure III.20 Effet du Co(II), Cu(II) et du Mn(II) sur la conformation d'HpNikR mesuré par le suivi de la fluorescence de l'ANS. Spectres d'émission de l'ANS seul et en présence d'HpNikR (3 μ M) avec différents ajouts de métal mesuré dans du 20mM MOPS pH7, 150mM KCl à 25°C après excitation à 370nm _ cut-off à 390nm.

La métallation du site de haute affinité et son impact sur les changements conformationnels subits par la protéine nous ont conduit à étudier l'impact du métal sur une protéine dépourvue de ce site, le mutant M1. Une étude préliminaire, réalisée par nos collaborateurs, a montré qu'une bactérie exprimant un tel mutant devenait sensible au stress métallique Ni(II) (Dian *et al.*, 2006)

Ceci confirmait que ce site était impliqué dans l'activité d'HpNikR. Mais qu'en est-il des propriétés *in vitro* du mutant ?

III.5. Caractéristiques du mutant H99A-H101A-C107S : M1

III.5.1. Généralités

L'étude des propriétés d'un triple mutant d'HpNikR, pour lequel trois résidus du site de haute affinité H99A, H101A et C107S ont été mutés, a été développée. La construction plasmidique a été faite par Kristine Schauer (Dian *et al.*, 2006).

La première étape de caractérisation a consisté en sa production et en sa purification. Cette dernière a été faite en utilisant le même protocole que la protéine sauvage (cf. Matériel & Méthodes). Une protéine pure et présentant le même état oligomérique que la protéine sauvage a été obtenue (Figure III.21). Le mutant d'HpNikR noté M1 est donc un tétramère.

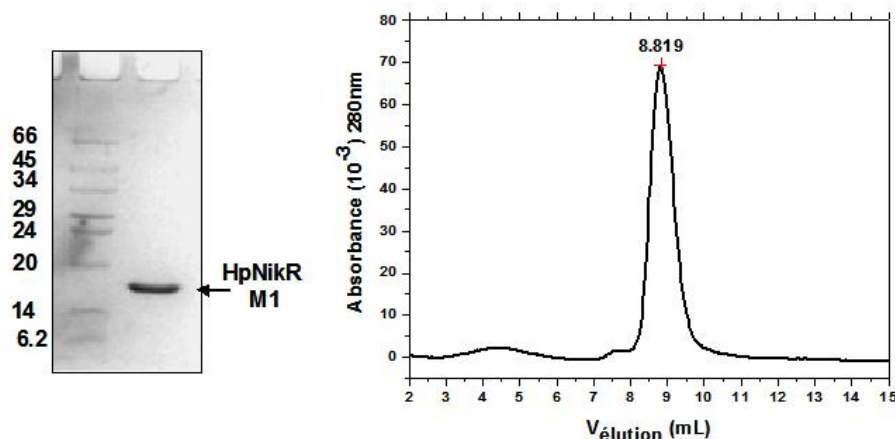


Figure III.21 A) SDS-PAGE d'HpNikR M1 purifiée B) Etat oligomérique d'HpNikM1. Profil obtenu sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique dans un tampon 20mM Tris/HCl pH7.4 400mM NaCl.

La masse de l'unité monomérique a été vérifiée par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes. La masse mesurée de 16999g/mol est en accord avec la masse théorique de 16998 g/mol. Le mutant M1 purifié ne présente pas d'adduit oxygéné.

Par ailleurs, ce mutant après purification ne contient pas non plus de métal (< 0.5 %) d'après un dosage fait avec du PAR.

La structuration de la protéine M1 au niveau secondaire et tertiaire a été comparée à celle de la protéine sauvage (Figure III.22).

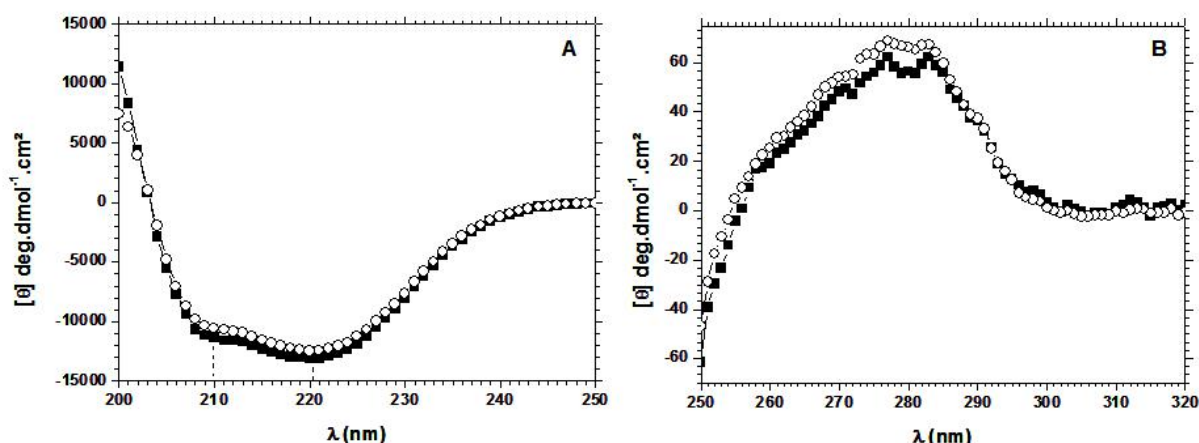


Figure III.22 A) Spectres CD enregistrés dans l'UV lointain et B) dans l'UV proche, normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus du monomère (HpNikR WT à 10μM ■ et M1 à 10μM ○). Les spectres ont été enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7, 40mM KCl. Le spectre du tampon est soustrait de chaque courbe expérimentale.

Les spectres CD en UV-lointain d'HpNikR WT et M1 sont identiques et présentent deux minima à 210 et 221 nm. Cela suggère que les mutations imposées n'ont pas modifié la structure secondaire initiale de la protéine (Figure III.22A). Il en est de même au niveau de la structure tertiaire (Figure III.22B).

III.5.2. Propriétés de métallation

Les propriétés de métallation par du Ni(II) de M1 ont été mesurées par spectroscopie d'absorption électronique, par suivi de la fluorescence du tryptophane et par suivi de la fluorescence de l'ANS.

III.5.2.1. Par spectroscopie d'absorption électronique

L'addition de Ni(II) sur le mutant HpNikR M1 n'est pas suivie de l'apparition de bande caractéristique comme dans le cas de la protéine sauvage (Figure III.23). Ce comportement est parfaitement normal dans la mesure où le site de haute affinité a été muté et n'existe plus. Cependant M1 a conservé sa capacité de précipitation qui débute au-delà de 2 équivalents. Cette précipitation est plus précoce que dans le cas de la protéine sauvage. Cette précipitation est bien liée à la métallation de sites annexes comme un site externe modifié.

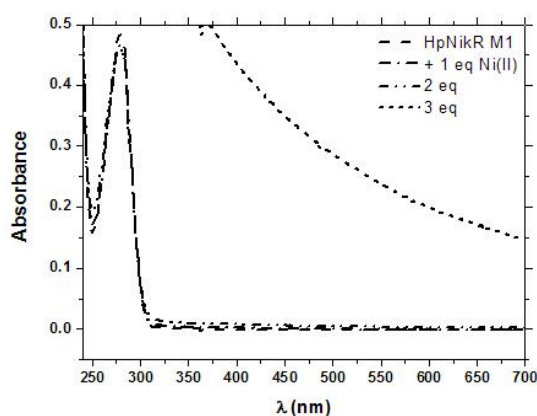


Figure III.23 Métallation d'HpNikR M1 par le nickel. Spectres d'absorption UV-Vis de HpNikR M1 à 47 μM à l'état apo et en présence de différents équivalents de nickel. Conditions : 20mM HEPES pH 8, 100mM NaCl 20°C. Sel métallique : NiSO₄.

III.5.2.2. Effet du Ni(II) sur la conformation de la protéine : suivi de la fluorescence

Dans un premier temps, la fluorescence du tryptophane du mutant M1 a été enregistrée. Son spectre d'émission montre que ce dernier est partiellement exposé au solvant puisque le λ_{max} d'émission est de 340 nm comme la protéine sauvage (Figure III.24A). La mutation n'a pas affecté l'environnement moyen du tryptophane du mutant. L'addition de Ni(II) ne modifie pas plus l'environnement du tryptophane que dans le cas de la protéine sauvage (aucun

déplacement n'est observé). Une légère variation de l'intensité est notable. Cette légère variation pourrait être liée à des effets de quench par des résidus proches du tryptophane. Cet aspect n'a pas pu être mesuré avec la protéine sauvage, en raison du quench intense observé lors de la métallation du site de haute affinité.

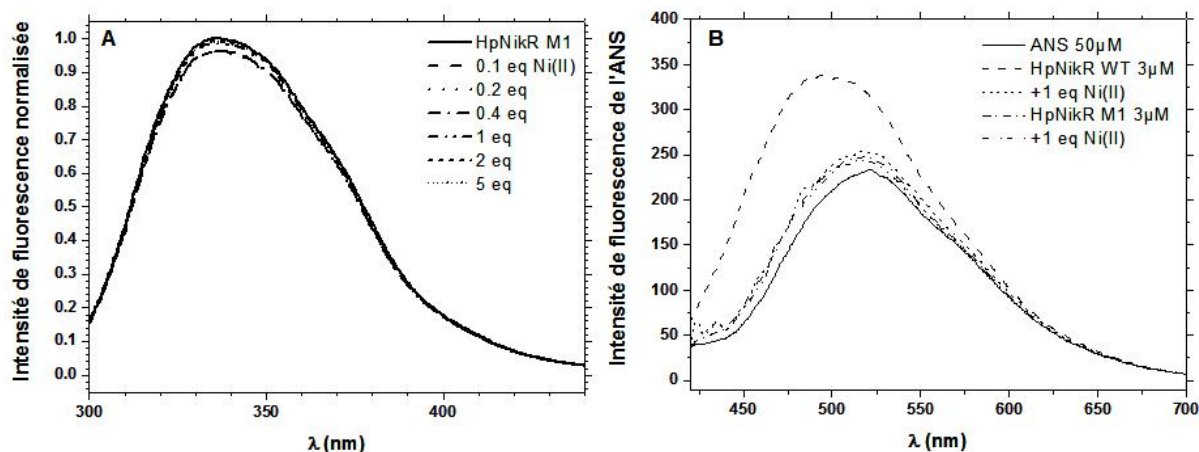


Figure III.24 Effets du Ni(II) et de la mutation sur la conformation d'HpNikR M1. A) Spectres d'émission de la fluorescence du tryptophane d'HpNikR M1 apo (3 µM) et en présence de différents équivalents de Ni(II) enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7 150mM KCl à 25°C après équilibration et après excitation à 295 nm _ cut-off à 290nm. B) Spectres d'émission de l'ANS seul et en présence d'HpNikR WT apo/M1 (3µM) et avec 1 équivalent de Ni(II) mesuré dans du 20mM MOPS pH7, 150mM KCl à 25°C après excitation à 370nm _ cut-off à 390nm.

Dans un second temps, la fluorescence de l'ANS en présence du mutant M1 et donc l'accessibilité de ses régions hydrophobes à cette molécule a été mesurée (Figure III.24B). La fluorescence moyenne de l'ANS en présence de M1 en comparaison à celle observée avec le WT est très différente. Son spectre d'émission est similaire à celui obtenu lorsque l'ANS est mis en présence d'HpNikR WT métallée par 1 équivalent de Ni(II). Ceci signifie que les régions hydrophobes de mutant M1 sont moins accessibles à l'ANS que pour la protéine sauvage apo. Sachant que les mutations affectent les sites de haute affinité qui sont présents à l'interface de tétramérisation, cela signifie que l'ANS ne doit plus pouvoir accéder à cette région. L'interface de M1 serait « fermée ». M1 présenterait *a priori* une conformation similaire à la protéine sauvage métallée. *In vivo*, un tel mutant ne permet pas à la bactérie de faire face au stress nickel, il ne doit pas assurer ses fonctions (liaison à l'ADN...). Sa conformation « fermeture de l'interface de tétramérisation » ne suffit donc pas à l'activation de la protéine. La métallation du site de haute affinité permet d'induire non seulement des changements au niveau du domaine de tétramérisation mais aussi au niveau des domaines de liaison à l'ADN. Les deux domaines « communiquent ». Il serait intéressant de résoudre la structure RX du mutant M1 afin de connaître l'organisation de son interface de tétramérisation.

III.6. Discussion

NikR d'*Helicobacter pylori*, tout comme sa protéine homologue chez *E.coli*, peut lier différents ions métalliques *in vitro* (Ni(II), Cu(II), Co(II), Mn(II)). D'après les données de spectroscopie d'absorption UV-Vis, elle est en mesure de lier 1 équivalent de Ni(II) ajouté par sous unité monomérique avant qu'une phase de saturation ne soit observée. Cette liaison métallique est la signature de la métallation du site de haute affinité (noté HA). HpNikR aurait donc bien quatre sites de haute affinité qui ne sont probablement pas tous égaux comme le discuterons plus tard. Des métallations similaires ont été obtenues en ajoutant du Cu(II) ou du Co(II) à HpNikR. Par contre la métallation du site HA par du Mn(II) ne semble pas évidente d'après nos données.

La nature du site HA semble varier selon le métal impliqué. Le site HA, pour le Ni(II) et pour le Cu(II), tend à présenter une géométrie similaire et identique à celle du site HA d'EcNikR à savoir une géométrie plan carré. Les ligands de la sphère de coordination du Ni(II) dans le site HA, d'après la résolution de la structure RX d'HpNikR, sont la cystéine 107, les histidines 99 et 101 d'une première unité monomérique et l'histidine 88' de l'unité monomérique adjacente (Dian *et al.*, 2006). Le site HA, pour le Co(II), serait quant à lui pentacoordonné avec une géométrie pouvant être une bipyramide trigonale ou encore une pyramide à base carrée.

Au-delà de la métallation des sites de haute affinité, deux caractéristiques sont notables en UV-Vis. Une phase de « saturation » est observée entre 1 et 3 équivalents de métal ajoutés, elle correspondrait à la métallation d'une seconde classe de site présentant une géométrie hexa ou pentacoordonnée dépourvue de cystéine dans la sphère de coordination. Au-delà de cette phase de saturation, HpNikR s'agrége. Cet état serait associé à la métallation de sites annexes. Ces sites lieraient plutôt du Cu(II) et du Ni(II). La métallation de cette troisième classe de sites pourrait dépendre de changements conformationnels induits par le métal dans le site HA mais pas uniquement. En effet bien que le mutant M1 d'HpNikR soit dépourvu de site HA, ce dernier a conservé sa propriété d'agrégation.

Les propriétés de métallation et d'agrégation d'HpNikR sont non seulement métal-dépendantes mais aussi pH-dépendantes. Pour des pH acides ($5 < \text{pH} < 6$), HpNikR est moins susceptible de s'agréger.

D'après les mesures faites par spectroscopie d'absorption électronique (double métallation) ainsi que par spectroscopie de fluorescence du tryptophane, l'affinité relative du site HA pour

ces différents métaux chez HpNikR semble suivre la série d'Irving-Williams concernant la stabilité des complexes métalliques, $Mn(II) \ll Co(II) < Ni(II) < Cu(II)$, tout comme chez EcNikR (Wang *et al.*, 2004).

Bien qu'HpNikR présente 4 sites de haute affinité (données de spectroscopie UV-Vis), ces sites ne seraient pas équivalents mais plutôt égaux 2 à 2 (données spectroscopie de fluorescence) sauf en présence de Co(II). On peut donc parler de 2 sites HA et de 2 sites HA'. Le suivi de la fluorescence du tryptophane montre que la liaison du Ni(II) ou du Cu(II) dans le site de haute affinité ne suit pas un modèle simple, mais tend plutôt à impliquer un mécanisme de coopérativité positive. Le suivi de la fluorescence de l'ANS montre que la liaison du Ni(II), du Cu(II) ou du Co(II) tend à rendre moins accessibles les zones hydrophobes de la protéine. L'addition de 2 Ni(II) suffit à rendre inaccessibles ces zones hydrophobes. Les premiers sites métallés étant les sites de haute affinité, alors la métallation des 2 premiers sites HA serait suffisante. L'étude du mutant M1, dépourvu de site de haute affinité, montre qu'il tend à ne pas présenter de zones hydrophobes accessibles à l'ANS. La fluorescence de l'ANS est similaire à celle observée pour HpNikR métallée par 1 équivalent de Ni(II). Ce site de haute affinité étant présent à l'interface de tétramérisation, l'hypothèse la plus simple voudrait que l'addition de Ni(II) rende aussi moins accessible cette région à l'ANS en induisant un changement conformationnel. Ce changement pourrait faciliter la liaison des deux autres Ni(II) dans les 2 sites HA' et/ou permettre une « communication » avec les domaines de liaison à l'ADN pour favoriser un basculement.

L'ensemble de nos données suggèrent l'existence de deux populations de sites de haute affinité notées HA et HA' qui présenteraient des propriétés spectroscopiques UV-Vis relativement proches. C'est pourquoi la liaison métal dans les sites HA et HA' s'effectuerait de façon linéaire entre 0 et 1 eq (Abraham *et al.*, 2006; Dosanjh *et al.*, 2007; Fauquant *et al.*, 2006). Cependant leurs affinités diffèreraient.

En 2006, le groupe de D. Zamble, qui considérait que les 4 sites HA étaient équivalents, a proposé que l'affinité du site HA pour le Ni(II) était de l'ordre du picomolaire (Abraham *et al.*, 2006). Un dosage indirect avec de l'EGTA avait été employé comme pour EcNikR. Cette valeur a dernièrement été revisitée par le groupe de S. Ciurli qui a montré par des mesures directes d'ITC que l'affinité serait plutôt de l'ordre de la dizaine de nanomolaire (Zambelli *et al.*, 2007). L'existence des sites de haute affinité égaux deux à deux a également été montrée par cette étude. En effet les 2 premiers sites HA auraient un $K_{dNi(II)}$ de 12nM et les 2 autres

auraient un $K_{dNi(II)}$ de 125 nM à pH7. La liaison du Ni(II) et l'affinité relative de ces sites pour ce métal seraient dépendantes du pH comme nous l'avons suggéré lors de notre étude (Fauquant *et al.*, 2006). En effet l'acidification tend à diminuer l'affinité des sites pour le métal ; à pH8, les sites HA et HA' auraient des Kds de 0,5 et 6 nM respectivement alors qu'à pH6,5 ces Kds seraient de 12 et 160 nM. La présence de 3 sites additionnels au site de haute affinité par sous unité monomérique ayant un K_d de 0,5 μ M a été observée. Zambelli *et al.* ont observé par ITC que la liaison des deux premiers Ni(II) suffisait à engendrer des changements conformationnels et ont fait l'hypothèse que ceux-ci pourraient permettre à la protéine de se lier à l'ADN (Zambelli *et al.*, 2007). Notre étude est en accord avec le fait que la liaison des deux premiers Ni(II) induit des changements conformationnels significatifs à la différence de la liaison des deux autres Ni(II). Cependant aucune de nos données ne nous permet de suggérer que ces changements permettraient la liaison à l'ADN. Nous pensons plutôt que la liaison des deux premiers Ni(II) dans les 2 sites HA faciliterait la fermeture de l'interface non verrouillée de la protéine pour alors faciliter la métallation des deux derniers sites HA' à l'interface verrouillée. Un basculement des domaines de liaison à l'ADN pourrait avoir lieu mais n'est pas mesurable avec nos données de fluorescence.

Le fait que les sites de haute affinité soient égaux deux à deux est également en accord avec l'asymétrie qui avait été mise en évidence lors de la résolution par nos collaborateurs de la structure RX d'HpNikR (Dian *et al.*, 2006). Cependant quelques soient les conditions de trempage des cristaux appliqués, aucune structure avec les quatre sites de haute affinité n'a été résolue. Dans le meilleur des cas, seuls deux sites HA étaient observés avec deux sites externes et deux sites intermédiaires. La métallation d'un site externe « modifié » pourrait d'ailleurs correspondre à la seconde classe de site métallique observée lors de nos titrations en UV-Vis.

Le site intermédiaire (Figure III.25), quant à lui, implique des ligands qui appartiennent à la sphère de coordination soit du site de haute affinité soit du site externe.

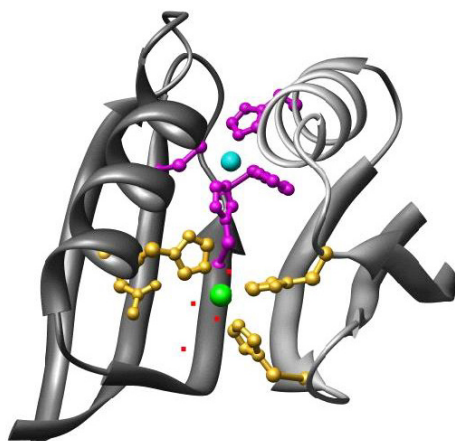


Figure III.25 Visualisation d'un site intermédiaire où l'ion Ni(II) est précisé en vert et d'un site de haute de affinité où l'ion Ni(II) est précisé en bleu chez HpNikR. Les molécules d'eau présentes autour du site intermédiaire sont précisées en rouge.

Les différents cristaux avec la protéine métallée ont été obtenus à des pH acides (4,6 et 5). Sachant que le pH influence l'affinité des sites dits de haute affinité (protonation différente des résidus/géométrie du site affectée ?), nous pourrions envisager qu'à ce pH (5) l'affinité des deux derniers sites HA' n'est pas favorable à la liaison du métal, c'est pourquoi le métal resterait au niveau du site intermédiaire dans le cristal. Bien qu'il soit difficile de distinguer en spectroscopie UV-Vis les deux types de sites de haute affinité, cela pourrait être tout de même envisagé en jouant sur le pH.

En effet, lors de notre étude des propriétés de métallation en fonction du pH (Figure III.6), nous avons pu noter qu'à pH 5,2, la métallation du site HA tendait à avoir lieu en 2 temps (Figure III.26). Il faudrait modifier les conditions expérimentales pour accentuer cette légère inflexion observable à 0,5 équivalent.

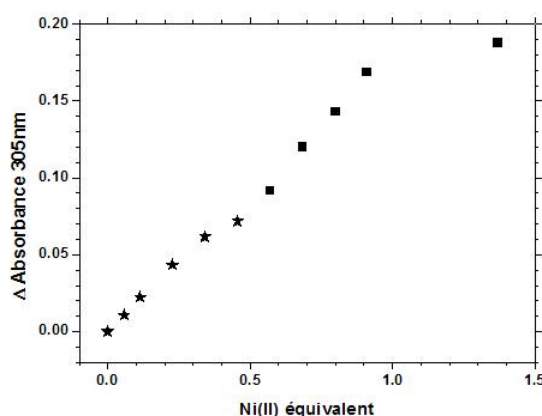


Figure III.26 Titration d'HpNikR par le nickel à pH 5,2. Première phase de métallation entre 0 et 0,5 eq : ★, seconde phase de métallation entre 0,5 et 1 eq : ■. Suivi de l'absorption à 305 nm en fonction de la quantité de nickel ajoutée. Conditions : 20mM HEPES pH 8, 100mM NaCl 20°C et 50mM Acétate de sodium pH6 ; 5,7 ou 5,2, 1M NaCl. Sel métallique : NiSO₄.

L'effet hypothétique du métal sur les changements conformationnels et du pH sur la protéine a été schématiquement représenté sur la [Figure III.27](#).

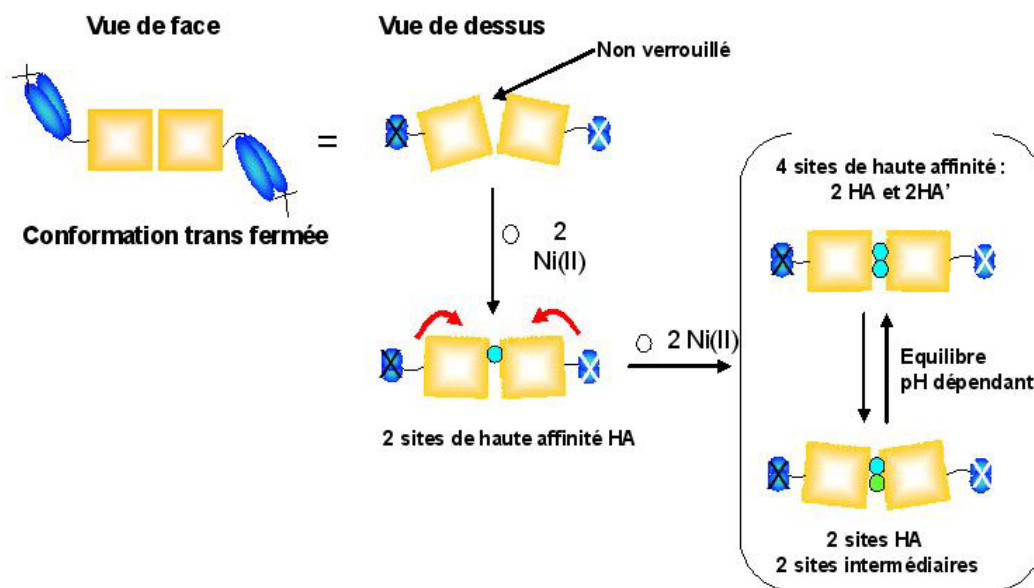


Figure III.27 Effet du métal sur la métallation des sites de haute affinité d'HpNikR. L'addition de 2 Ni(II) permettrait la métallation des 2 premiers sites HA et induirait des changements de conformations (flèches en rouge) qui permettraient la métallation des 2 derniers sites HA'. En fonction du pH imposé, la métallation des 2 sites HA' pourrait plutôt être en compétition plutôt avec la métallation des sites intermédiaires.

Afin d'améliorer la caractérisation des sites métalliques impliqués dans le cheminement du métal dans la protéine en solution et les changements conformationnels subits par la protéine, des études de cinétique rapide en UV-Vis et en fluorescence pourraient être développées. Ces mesures de cinétique pourraient être couplées à du « freeze quench » afin d'étudier par des techniques spectroscopiques les complexes intermédiaires de la métallation.

Il serait également intéressant de résoudre la structure RX du mutant M1 afin de connaître l'organisation de l'interface de tetramérisation. La résolution d'un complexe ANS-HpNikR et ANS-HpNikR-Ni permettrait de mieux comprendre le changement conformationnel induit par le métal. La caractérisation d'un second mutant dont les sites externe et intermédiaire seraient délétés, permettrait de compléter la caractérisation des sites de haute affinité. Ces sites de haute affinité seraient-ils toujours égaux deux à deux ou alors tous équivalents ? Les ligands de la sphère de coordination et la géométrie du site seraient-ils identiques à ceux identifiés pour le site de haute affinité classique ?

III.7. Références

- Abraham, L. O., Li, Y. & Zamble, D. B. (2006). The metal- and DNA-binding activities of *Helicobacter pylori* NikR. *J Inorg Biochem* 100, 1005-1014.
- Banci, L., Bencini, A., Benelli, C., Gatteschi, D. & Zanchini, C. (1982). Spectral-Structural Correlations in High-Spin Cobalt(II) complexes. In *Structure and Bonding*, pp. 37-86. Edited by Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York.
- Chou, C. J., Wisedchaisri, G., Monfeli, R. R., Oram, D. M., Holmes, R. K., Hol, W. G. & Beeson, C. (2004). Functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* iron-dependent regulator. *J Biol Chem* 279, 53554-53561.
- Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Labigne, A. (2003). Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 49, 947-963.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2005). *In vitro* analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187, 7703-7715.
- Dian, C., Schauer, K., Kapp, U., McSweeney, S. M., Labigne, A. & Terradot, L. (2006). Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol* 361, 715-730.
- Dosanjh, N. S., Hammerbacher, N. A. & Michel, S. L. (2007). Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA) DNA interaction: metal ion requirements and sequence specificity. *Biochemistry* 46, 2520-2529.
- Dunning Hotopp, J. C., Auchtung, T. A., Hogan, D. A. & Hausinger, R. P. (2003). Intrinsic tryptophan fluorescence as a probe of metal and alpha-ketoglutarate binding to TfdA, a mononuclear non-heme iron dioxxygenase. *J Inorg Biochem* 93, 66-70.
- Ernst, F. D., Kuipers, E. J., Heijens, A., Sarwari, R., Stoof, J., Penn, C. W., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2005). The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 73, 7252-7258.
- Fauquant, C., Diederix, R. E., Rodrigue, A., Dian, C., Kapp, U., Terradot, L., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (2006). pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* NikR. *Biochimie* 88, 1693-1705.
- Maret, W. & Vallee, B. L. (1993). Cobalt as probe and label of proteins. In *Methods in Enzymology*, pp. 52-71.
- Rupcich, N., Chiuman, W., Nutiu, R., Mei, S., Flora, K. K., Li, Y. & Brennan, J. D. (2006). Quenching of fluorophore-labeled DNA oligonucleotides by divalent metal ions: implications for selection, design, and applications of signaling aptamers and signaling deoxyribozymes. *J Am Chem Soc* 128, 780-790.
- Stingl, K., Uhlemann Em, E. M., Deckers-Hebestreit, G., Schmid, R., Bakker, E. P. & Altendorf, K. (2001). Prolonged survival and cytoplasmic pH homeostasis of *Helicobacter pylori* at pH 1. *Infect Immun* 69, 1178-1180.
- Tao, X., Zeng, H. Y. & Murphy, J. R. (1995). Transition metal ion activation of DNA binding by the diphtheria tox repressor requires the formation of stable homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6803-6807.
- Vasak, M., Kagi, J. H., Holmquist, B. & Vallee, B. L. (1981). Spectral studies of cobalt (II)- and Nickel (II)-metallothionein. *Biochemistry* 20, 6659-6664.
- Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10018-10028.
- Zambelli, B., Bellucci, M., Danielli, A., Scarlato, V. & Ciurli, S. (2007). The Ni(2+) binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)*, 3649-3651.

Chapitre IV

La liaison à l'ADN d'HpNikR

IV.1. La liaison sur *pureA* et *pnixA*

IV.1.1. Objectif de l'étude

HpNikR est une protéine métallorégulatrice qui peut soit réprimer, soit activer la transcription de certains gènes (Contreras *et al.*, 2003). Ce mécanisme d'activation n'est pas décrit pour EcNikR. Il n'est pas compris comment HpNikR peut assurer des régulations aux antipodes alors qu'elle semble ne reconnaître qu'un motif consensus (Delany *et al.*, 2005). Son mode de régulation est-il lié uniquement au positionnement de sa séquence opératrice par rapport au promoteur, ou bien dépend-il également des caractéristiques du complexe ADN/Protéine métallée formé ? Nous avons voulu comprendre les mécanismes impliqués dans ces modes de régulation, nous avons donc choisi d'étudier la liaison d'HpNikR sur la séquence opératrice du promoteur *pureA* ainsi que sur la séquence opératrice du promoteur *pnixA*. HpNikR active la transcription des gènes de l'opéron *ureAB* (Contreras *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2002) et réprime la transcription du gène *nixA* de façon Ni(II) dépendante (Wolfram *et al.*, 2006). Lorsque cette étude a été initiée, différents travaux relatant la liaison d'HpNikR sur sa région opératrice en amont de *pureA* ainsi que sur sa région opératrice sur *pnixA* avaient été publiés (Abraham *et al.*, 2006; Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005) (Figure IV.1). Les régions protégées par HpNikR avaient été déterminées par empreinte à la DNaseI en présence d'un large excès de Ni(II) (Abraham *et al.*, 2006; Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005). Ces travaux ont été effectués avec une protéine HpNikR taggée en N-ter (His-tag clivé partiellement ou Strep-tag) (Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005).

A) *pureA*

```

-145 TAAATTCTAA AGGGGTATTA AACGCACTTC TAATAACGAT TTTATAGCGC TTCAAAGATA -86
                                     ————
-85  TAACACTAAT TCATTTTAAA TAATAATTAG TTAATGAACG CTTCTGTTAA TCTTAGTAAA -26
      —————
-25  TCAAAACATT GCTACAATTA CATCCAACTT TGATTTCGTT ATGTCTTCAA GGAAAAACAC +35

+36  TTAAAGAATA GGAGAATAAG ATGCTG

```

B) *pnixA*

```

- 13 AAATATATTACAATTACCAAAAAAGTATTATTTTTC +21

```

Figure IV.1 A) Séquence en amont du gène *ureA* chez *Helicobacter pylori* 26695. La numérotation est fonction du +1 de transcription (souligné/gras). La région protégée par HpNikR en empreinte à la DNaseI est précisée : de -88 à -57 (—) (Delany *et al.*, 2005) et de -93 à -58 (— —) (Ernst *et al.*, 2005). B) Séquence protégée par Strep-tag HpNikR sur *pnixA* visualisée en empreinte à la DNaseI (Ernst *et al.*, 2005). Le +1 de transcription est souligné.

L'affinité d'HpNikR pour *pnixA* n'était pas connue lorsque l'étude a été initiée contrairement à celle pour *pureA*. Son Kd pour cette région fluctue entre 9 et 50nM selon l'excès de nickel et la technique employée (empreinte à la DNaseI / EMSA) (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007). Tout comme pour EcNikR, un complexe ADN/HpNikR ne peut être visualisé en EMSA sans qu'un excès de métal ne soit ajouté.

Afin de savoir si le mode de régulation était dépendant de la nature du complexe ADN/Protéine, nous avons opté pour une approche cristallographique en essayant de cristalliser et de résoudre en collaboration avec L. Terradot et G. Natrajan de l'ESRF-Grenoble les structures des complexes *pureA*/HpNikR et *pnixA*/HpNikR. Dans un premier temps, les séquences d'ADN minimales pour observer un complexe ADN/Protéine ont été choisies pour ensuite être utilisées pour les études cristallographiques menées par G. Natrajan (Post-doc). L'utilisation d'une séquence oligonucléotidique courte pour former des complexes ADN/Protéine permet de limiter la taille du complexe à cristalliser ainsi que sa flexibilité et donc d'augmenter la probabilité de le cristalliser.

L'affinité d'HpNikR pour ces séquences a été mesurée en EMSA. La stoechiométrie de liaison d'HpNikR à l'ADN a également été déterminée.

IV.1.2. Choix des séquences oligonucléotidiques

Trois séquences ont été choisies, pour observer ou non la liaison d'HpNikR à *pureA* et *pnixA* (Figure IV.1). Les plus longues séquences ont été déterminées en tenant compte des empreintes à la DNaseI observées sur un seul brin d'ADN (Abraham *et al.*, 2006; Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2005).

Pour *pureA*, des séquences de 40 pb[§] (-93 à -56 par rapport au TSP), 34 pb (-89 à -56) et 32 pb (-88 à -57) ont été testées. La séquence de 40 pb présente en 5' et en 3' une base aspécifique supplémentaire (soulignée).

```

40 pb : 5' GCAAAGATATAACACTAATTCATTTTAAATAATAATTAGG 3'
34 pb : 5' GATATAACACTAATTCATTTTAAATAATAATTAG 3'
32 pb : 5' ATATAACACTAATTCATTTTAAATAATAATTA 3'

```

[§] Numérotation similaire à celle employée dans la [Figure IV.1](#)

Pour *pnixA*, des séquences de 43 pb (-15 à +22 par rapport au TSP), 34 pb (-12 à +20) et 32 pb (-11 à +19) ont été testées. La séquence de 43pb présente en 5' et en 3' deux bases aspécifiques supplémentaires (soulignées).

43 pb : 5' GGCAAAATATATTACAATTACCAAAAAAGTATTATTTTCTGG 3'
 34 pb : 5' AATATATTACAATTACCAAAAAAGTATTATTTT 3'
 32 pb : 5' ATATATTACAATTACCAAAAAAGTATTATTTT 3'

La liaison à l'ADN a été mesurée par la technique des gels retards en présence d'un excès de Ni(II) dans le tampon de complexation et dans le tampon de migration (Figure IV.2). Quelque soit la taille du duplex oligonucléotidique testé, et quelque soit la séquence (*pureA* ou *pnixA*), un seul complexe ADN/Protéine est observé. La taille minimale de 32pb pour l'ADN est donc suffisante pour observer un complexe de liaison. L'affinité d'HpNikR pour ces deux oligonucléotides *pureA32* et *pnixA32* pouvait être déterminée. Les oligonucléotides de 34 et 32 pbs ont été utilisés pour les tests de cristallographie.

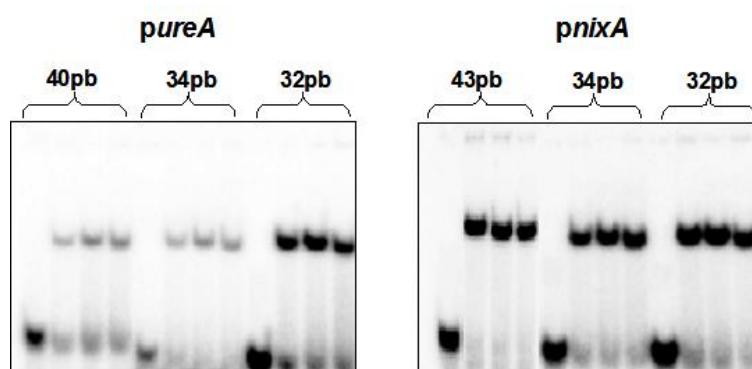


Figure IV.2 Suivi par EMSA de la liaison d'HpNikR sur des oligonucléotides *pureA* et *pnixA* de différentes tailles en présence d'un excès de Ni(II). HpNikR à 0, 50 et 500 nM (deux répétitions) a été incubée avec les oligonucléotides à 500pM marqués au préalable au ^{32}P dans un tampon de complexation contenant 20 mM BisTrisBorate pH7.4, 50 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 2,5% Glycérol, 100 μM NiCl_2 . Le produit réactionnel est mis à migrer dans un gel à 7% d'acrylamide. Le gel et le tampon de migration contiennent 100 μM de Ni(II) (Sel NiCl_2).

IV.1.3. Avancement de l'étude cristallographique

Des premiers essais de cristallisation ont été faits en utilisant les séquences *pureA32/34* et *pnixA32/34* et HpNikR contenant 1 équivalent de Ni(II) par site de haute affinité (suivie de la métallation en UV-Vis). Sur les différentes conditions testées, 4 conditions pour lesquelles la protéine et l'ADN étaient présents dans un ratio 1:1 (40 μM [HpNikR-Ni] $_4$: 40 μM ADN), ont permis l'obtention de cristaux. Cependant ces cristaux correspondaient à de la protéine apo. De nouveaux essais vont être initiés.

IV.1.4. Détermination de la stoechiométrie de liaison à l'ADN

La stoechiométrie de liaison d'HpNikR à l'ADN a été déterminée en utilisant la technique des gels retard associée à la technique d'analyse du Ferguson (cf. Matériel & Méthodes). Elle a été déterminée non seulement pour les séquences *pureA* et *pnixA* mais aussi pour les séquences *NiFu* et *nikRS2* appartenant à la région intergénique *nikR-exbB* qui seront étudiées par la suite (IV.2 p- 229 -). Il s'est avéré que les rapports frontaux vrais RF calculés pour l'ADN libre ainsi que pour l'unique complexe Protéine:ADN sont identiques pour les différentes séquences étudiées. Leurs poids moléculaires apparents sont similaires et la stoechiométrie de liaison d'HpNikR à l'ADN est donc indépendante de la séquence étudiée (Figure IV.3). Les poids moléculaires apparents de l'ADN libre et du complexe ont été calculés après avoir déterminé la pente moyenne caractéristique de la taille de la molécule. L'ADN libre a un poids apparent de 25 kDa (PM théorique : 26 – 31 kDa selon la séquence). Le complexe Protéine:ADN a un poids apparent de 99 kDa, ce complexe correspondrait à la liaison de 1 tétramère pour 1 ADN (PM théorique : 94 kDa – 100kDa).

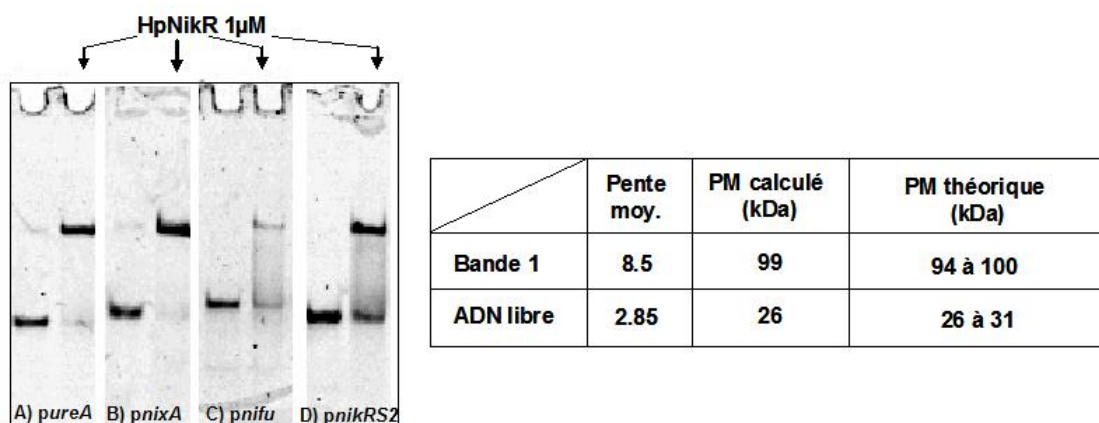


Figure IV.3 Détermination de la stoechiométrie de liaison d'HpNikR à l'ADN en présence d'un excès de Ni(II) 100μM. 4 séquences ont été testées A) *pureA* 40pb B) *pnixA* 43pb C) *NiFu* 47pb et D) *nikRS2* 44pb. La migration est faite dans des gels à 7% d'acrylamide ayant migré simultanément (A et B // C et D). Les rapports frontaux RF de l'ADN libre et du complexe protéique sont similaires pour les 4 séquences testées ($RF_{ADN\ libre} : 0.59$ et $RF_{complexe} : 0.35$). Les poids moléculaires apparents de l'ADN libre et du complexe Protéine:ADN ont été déterminés selon la technique de Ferguson (présentée en Matériel & Méthodes). La pente approximative a été calculée à partir de deux jeux de données faits avec des gels à 7 et à 9% d'acrylamide.

La stoechiométrie de liaison d'HpNikR à l'ADN suit le rapport 1:1. Cette donnée va nous permettre par la suite de choisir un modèle d'ajustement simple des données expérimentales où 1 tétramère lie 1 ADN. Par la suite, les concentrations protéiques et les Kds seront exprimés en fonction de la concentration par sous unité monomérique.

IV.1.5. Affinité d'HpNikR pour *pnixA* et *pureA*IV.1.5.1. Affinité d'HpNikR pour *pnixA32*

L'affinité d'HpNikR pour sa séquence opératrice chevauchant le promoteur *pnixA* a été déterminée par EMSA en présence d'un excès de Ni(II) à partir de 4 jeux de gel dont l'un d'entre eux est présenté en Figure IV.4. Deux concentrations d'ADN ont été testées (50 et 250 pM), les données étant similaires, la concentration de 250 pM a été utilisée pour mesurer le Kd.

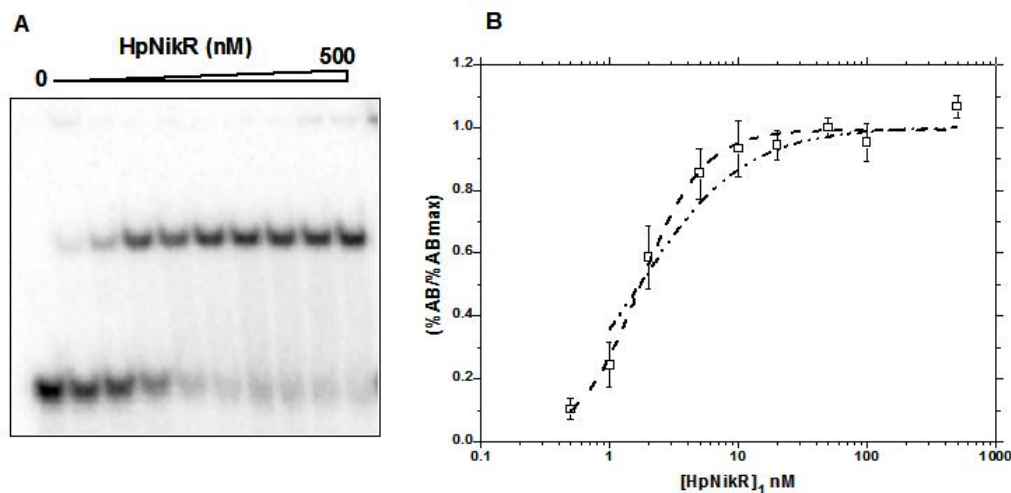


Figure IV.4 A) Liaison d'HpNikR à *pnixA32* en présence d'un excès de Ni(II). HpNikR (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 et 500nM) incubé avec 250pM de *pnixA32* en présence de dIdC à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7,4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2,5% Glycérol, 0,1% Triton et 100µM de NiCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon 100mM (BisTris Borate pH7,4) contiennent du Ni(II) à 100µM (NiCl₂). B) 4 jeux de gels ont été exploités pour déterminer le Kd, un modèle simple (---) et le modèle de Hill (---) ont été utilisés pour ajuster les données.

Deux modèles ont été testés afin d'ajuster les données expérimentales. Sachant que la stoechiométrie de liaison est de 1:1, un modèle simple de type $A + B \leftrightarrow AB$ a été appliqué.

La résolution de l'équation quadratique correspondante :

$$y = \frac{(Kd + Bt + At) - \sqrt{(Kd + Bt + At)^2 - 4 \times At \times Bt}}{2 \times At} \quad \text{où } y \text{ correspond à la fraction d'ADN lié}$$

(soit AB/AB_{\max}), Bt correspond à la concentration totale du complexe Protéine-Métal, At correspond à la concentration totale d'ADN, n'a pas permis d'ajuster les données expérimentales ($Kd : 1,4nM \pm 0,3$) (Figure IV.4). Le second modèle testé pour ajuster ces données, consiste en la résolution de l'équation de Hill. Les données ont été ajustées par ce modèle, le Kd calculé est de $1,7 nM \pm 0,15$ et le coefficient de Hill est de $1,8 \pm 0,2$. Ce Kd est du même ordre de grandeur que celui mesuré par le modèle simple. Le coefficient de Hill est supérieur à 1, ceci signifie que la liaison à l'ADN ne s'effectuerait pas aussi simplement.

IV.1.5.2. Affinité d'HpNikR pour *pureA32*

L'affinité d'HpNikR pour sa séquence opératrice en amont du promoteur *pureA* a également été déterminée par EMSA en présence d'un excès de Ni(II) à partir de 4 jeux de gel dont l'un d'entre eux est présenté en Figure IV.5.

La liaison maximale est de 70%, avec une perte moyenne de la radioactivité d'environ 20% pour les concentrations en protéine supérieures à 50 nM. Cette perte pourrait être liée à une éventuelle précipitation de la protéine et n'a pas été prise en compte pour la détermination du K_d apparent.

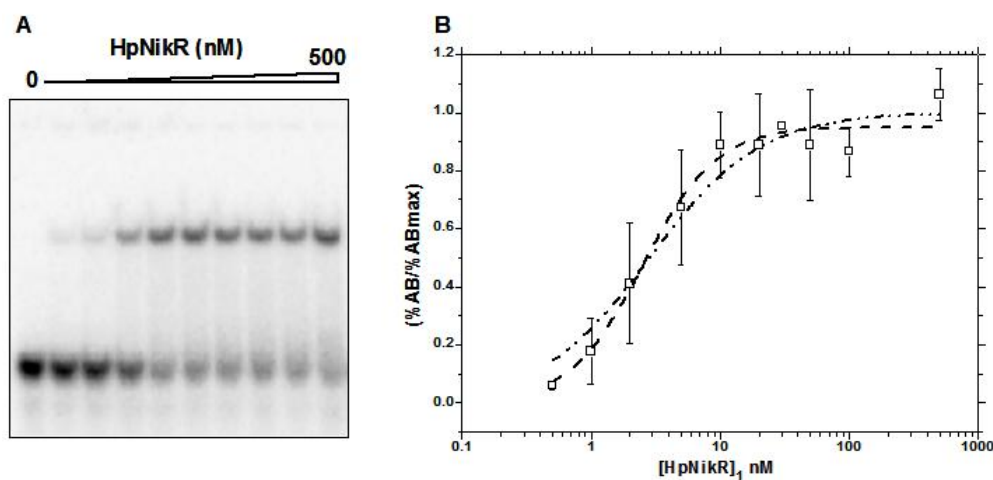


Figure IV.5 A) Liaison d'HpNikR à *pureA32* en présence d'un excès de Ni(II). HpNikR (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 et 500nM) incubé avec 250pM de *pureA32* en présence de dIdC à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100µM de NiCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du Ni(II) à 100µM (NiCl₂). B) 4 jeux de gels ont été exploités pour déterminer le K_d , un modèle simple (---) et le modèle de Hill (---) ont été utilisés pour ajuster les données.

De nouveau le modèle simple et le modèle de Hill ont été testés pour ajuster les données expérimentales. Les données ont été mieux ajustées par le second modèle, le K_d calculé est de $2,5 \text{ nM} \pm 0,3$ et le coefficient de Hill est de $1,5 \pm 0,3$.

Les K_d d'HpNikR pour *pureA32* et pour *pnixA32* sont du même ordre de grandeur. L'affinité d'HpNikR pour ces deux séquences opératrices ne semble pas être impliquée dans le mécanisme de régulation positive ou négative mis en jeu.

Il est intéressant de noter que bien que le rapport du complexe ADN/Protéine soit de 1:1, la liaison ne semble pas s'effectuer simplement ($1,5 < n < 2$).

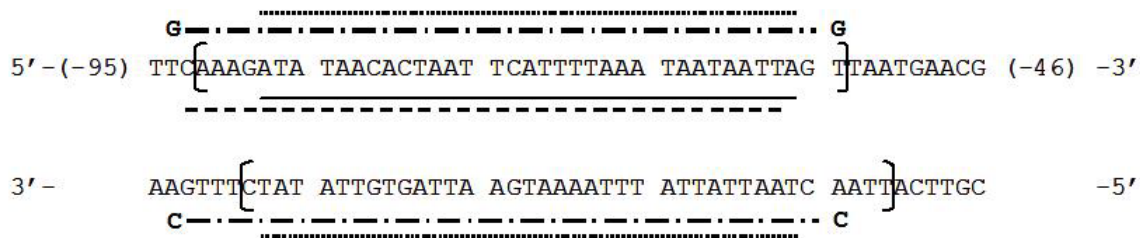
Une détermination rapide du K_d de liaison d'HpNikR sur les séquences *pureA40* et *pnixA43* montre que celui-ci serait légèrement plus élevé ($5\text{nM} < K_d < 15\text{nM}$) que les K_d s des

séquences de 32pb et que le coefficient de Hill ne serait pas aussi prononcé ($1 < n < 1,5$). La longueur de la séquence semble influencer la liaison d'HpNikR à l'ADN (Kd, mode de liaison plus simple). Deux hypothèses peuvent expliquer cette variation :

- Des effets de bord pourraient avoir lieu en raison d'un appariement incomplet aux extrémités des duplex de 32pb alors que ces dernières sont impliquées dans des interactions importantes avec la protéine. L'addition de bases annexes et plus précisément de guanines stabiliserait le duplex aux extrémités.
- Des interactions supplémentaires de la protéine avec les bases présentes en bordure des séquences proposées par Delany *et al.* et Ernst *et al.* (séquence de 32pb) pourraient avoir lieu sur les séquences de 40 et 43 pb. Ces séquences initialement ont été déterminées à partir d'un footprint fait sur un brin d'ADN. Un décalage des régions protégées pourrait toutefois exister entre les deux brins.

Cette dernière hypothèse semble la plus plausible d'après des travaux récemment publiés par le groupe de P. Chivers. En effet, il a été montré par différentes techniques d'empreintes (DNaseI, Fe-EDTA, DMS) employées sur les 2 brins des séquences opératrices *pureA* et *pnixA* que les régions d'ADN protégées par la protéine sauvage étaient décalées (Figure IV.6) (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007).

Séquence opératrice de *pureA*



Séquence opératrice de *pnixA*



Figure IV.6 Séquences opératrices liées par HpNikR pour réguler la transcription des gènes *ureAB* et *nixA*. Les régions protégées sur ces séquences par HpNikR ont été identifiées par des empreintes à la DNaseI. Les régions identifiées lors des travaux de Benanti *et al.* (2007) sont précisées entre crochets. Les régions identifiées lors des travaux de Delany *et al.* (2005) et Ernst *et al.* (2005) sont soulignées : (—) et (---). Les oligonucléotides utilisés dans notre étude sont précisés : 40/43 pb (— · — ·) et 32 pb (····).

Le fait que des interactions supplémentaires puissent avoir lieu, n'enlève rien au fait que les motifs de 32pb soient suffisants pour qu'HpNikR se lie avec une affinité de l'ordre du nanomolaire à l'ADN. L'influence de ces potentielles interactions sera rediscutée plus tard.

IV.1.6. Les dernières avancées de la littérature ...

Alors que nous réalisons l'étude de la liaison d'HpNikR sur *pureA* et sur *pnixA*, deux nouvelles études dont l'étude faite par le groupe de P. Chivers (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007), ont été publiées. Ces travaux tendent à montrer l'influence des métaux et de l'extension N-ter d'HpNikR sur sa liaison à l'ADN (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007).

L'équipe de S. Michel a montré lors d'une étude par anisotropie de fluorescence que l'excès de Ni(II) ou de Cu(II) ne suffisait pas pour permettre l'observation d'une liaison d'HpNikR à *pureA* (Dosanjh *et al.*, 2007). Un second métal serait nécessaire (Mg(II), Ca(II) ou Mn(II)) pour qu'une liaison à l'ADN ait lieu (variation d'anisotropie Δr : 0.03). Un duplex oligonucléotidique de 49pb (-96 à -48 par rapport au TSP) présentant une thymine centrale marquée à la fluorescéine a été utilisé (cf. ci-dessous).

5' - CTTCAAAGATATAACACTAAT ***TC***ATTTTAAATAATAATTAGTTAATGAA - 3'

Figure IV.7 Séquence oligonucléotidique utilisée lors de l'étude de Dosanjh *et al.*, les sites potentiels de liaison d'HpNikR sont soulignés, la thymine marquée à la fluorescéine est en gras/italique (Dosanjh *et al.*, 2007).

Lors de ces expériences il a été montré que bien que cette liaison soit spécifique, elle était surtout dépendante d'une perturbation de l'environnement de la fluorescéine accompagnée d'une perte d'intensité de fluorescence de la sonde (perte intensité Q : 0,45 ou $Q = \text{Int}_{\text{bound}}/\text{Int}_{\text{free}}$).

Les résultats obtenus par mesure de « l'anisotropie de fluorescence » sont assez différents de ceux observés en empreinte à la DNase I en conditions stoechiométriques, ou en EMSA. Cette différence a été expliquée par le fait que pour la réalisation de ces deux dernières techniques du Mg(II) ou du Ca(II) sont ajoutés dans les tampons (de complexation et/ou de migration).

Nous avons déjà mis en place des expériences d'anisotropie de fluorescence et d'EMSA afin de tester l'effet du nickel sur la liaison d'HpNikR sur *pureA*, suite à la publication du groupe de S. Michel nous avons testé l'effet du magnésium (sa nécessité).

Les mesures d'anisotropie ont été faites sur le duplex oligonucléotidique de 40 pb ayant une fluorescéine en 5'. La sonde fluorescente ne perd pas plus de 10% de son intensité ($Q : 0,90$). HpNikR ne perturbe pas l'environnement direct de la sonde. Les mesures effectuées sont bien représentatives de son anisotropie.

Des titrations protéiques ou métalliques ont été menées (Figure IV.8). Les titrations protéiques (Figure IV.8A) ont été faites soit avec les conditions classiques d'anisotropie utilisées au laboratoire (Tampon 20mM MOPS pH7 150mM KCl sans Mg(II) en présence de 100 μ M de NiCl₂) soit dans du tampon de complexation d'EMSA (20mM BisTrisBorate, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100 μ M NiCl₂).

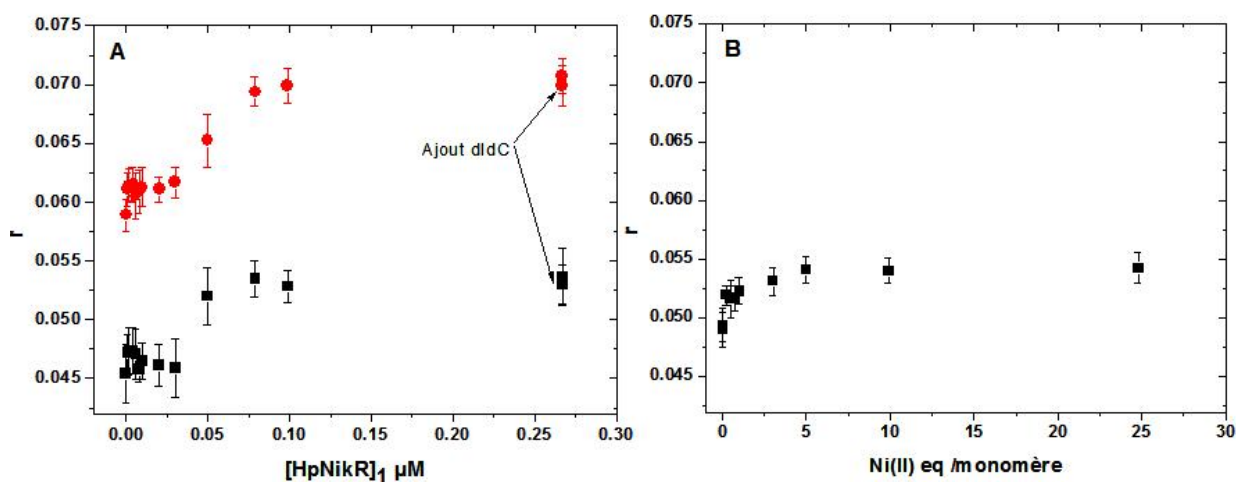


Figure IV.8 Liaison d'HpNikR à *pureA*-FI (40pb) suivie par anisotropie de fluorescence. A) Titration protéique. 20nM de duplex sont mis dans du MOPS 20mM pH7, KCl 150mM, NiCl₂ 100 μ M (■) ou dans du 20mM BisTrisBorate pH7.5, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton, 100 μ M NiCl₂ (●), auxquels est ensuite ajouté HpNikR. L'ajout d'ADN compétiteur ne change pas l'anisotropie. La variation d'anisotropie est bien spécifique. B) Titration par le Ni(II). 20nM de duplex ainsi que 2,5 μ M d'HpNikR sont mis dans du 20mM MOPS pH7, 150mM KCl (■) puis du Ni(II) est ajouté. Le Ni(II) seul permet la liaison à l'ADN.

Le niveau de référence de l'anisotropie en absence de protéine diffère en raison de la présence, entre autres, du Mg(II) qui se lie à l'ADN et donc change l'anisotropie. Quelque soit la condition appliquée, HpNikR se lie à l'ADN même en présence d'un excès de Ni(II) qu'il y ait ou non du Mg(II). La liaison mesurée est spécifique comme le montre l'absence de variation d'anisotropie quand l'ADN compétiteur est ajouté. La variation d'anisotropie est faible ($\Delta r : 0,01$) à partir de 0,045. Pour une anisotropie de 0,045, d'après l'équation de Perrin (cf. Matériel & Méthodes) le temps de corrélation serait de 1,2ns et passerait à 1,5ns avec la liaison de la protéine ($\Delta r : 0,01$). Le temps de corrélation de la sonde après liaison n'est donc pas de l'ordre de grandeur du temps de demi-vie de la fluorescéine (4ns). La liaison de la protéine doit entraîner une faible variation de la masse volumique.

Pour obtenir une variation d'anisotropie plus importante, nous pourrions tester des duplex oligonucléotidiques plus courts bien que cela ne soit pas conseillé d'après les données d'EMSA. Nous pourrions également changer la sonde fluorescente (temps de demi-vie plus court) ou alors positionner notre sonde au niveau central comme Dosanjh *et al.*. Dans cette dernière proposition, nous ne mesurerions plus l'anisotropie mais plutôt la variation de l'intensité de la fluorescence.

La titration métallique (Figure IV.8B) faite en absence de magnésium montre que la liaison d'HpNikR à l'ADN est bien Ni-dépendante. La présence de moins de 1 équivalent de Ni(II) semble suffire à cette liaison dans les conditions testées. Dans ces conditions, suffisamment de protéines seraient actives pour se lier au 20nM d'ADN. De nouveau, la variation d'anisotropie est trop faible pour permettre une conclusion définitive ($\Delta r : 0,007$).

Des gels retard ont également été réalisés afin de mesurer la liaison d'HpNikR à *pureA32* en fonction des sels métalliques imposés pendant la complexation ADN/Protéine ainsi que pendant la migration.

Lorsque HpNikR est mise à incuber avec de l'ADN avec différents excès de sels (aucun sel, 100 μ M NiCl₂, 3mM MgCl₂ ou 100 μ M MnCl₂) puis que le complexe est mis à migrer dans un tampon sans sel métallique, aucun complexe ADN/Protéine n'est observé (Figure IV.9).

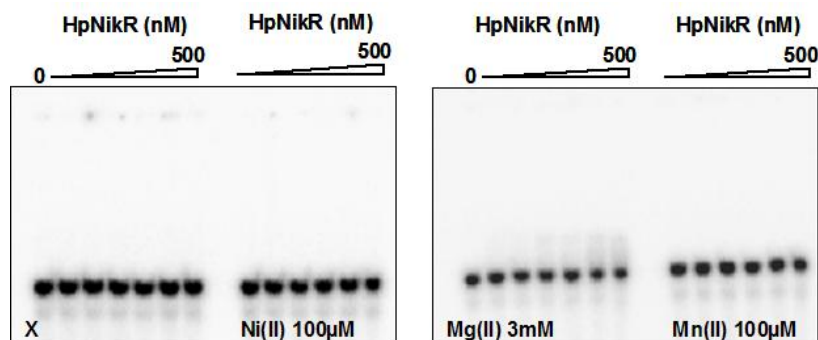


Figure IV.9 Effet des sels contenus dans le tampon de complexation ADN/Protéine sur la liaison d'HpNikR à *pureA32*. HpNikR (0 ; 2 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 et 500nM) est mise à incuber avec 250pM de *pureA32* en présence de dIdC à 1,5 μ g/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et X : rien ou 100 μ M de NiCl₂ ou 3mM MgCl₂ ou 100 μ M MnCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon (100mM BisTris Borate pH7.4) ne contenaient aucun sel.

Ces données sont en accord avec la littérature, HpNikR apo ne peut pas se lier à l'ADN en absence de métal et un excès de métal est nécessaire pendant la migration pour observer un complexe. Deux hypothèses peuvent expliquer un tel comportement :

- soit HpNikR présente un second site métallique de basse affinité qui doit être métallé pour l'observation du complexe (site entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de tétramérisation, le site externe modifié...). Cette hypothèse initialement reposait sur le fait que le K_d du site de haute affinité était picomolaire et donc que 100% de protéine était métallée dans le site HA. Cependant ce n'est pas le cas d'après les K_d s mesurés par le groupe de S. Ciurli (Zambelli *et al.*, 2007).
- soit le complexe ADN/Protéine est déstabilisé par l'effet de dilution des sels métalliques et/ou par le champ électrique imposés lors la migration (en comparaison aux données obtenues en anisotropie)

Des gels similaires ont été réalisés en mettant dans le tampon de migration 100 μ M de NiCl_2 . Les retards sur gel observés sont présentés ci-dessous. Les données obtenues sont comparées à celles obtenues pour la détermination du K_d de liaison d'HpNikR à *pureA32* dans les conditions Ni(II) en incubation (et Mg(II)) et Ni(II) en migration (noté NiMg/Ni) (Figure IV.10). En absence ou en présence de sels (Ni ou Mg ou Mn) pendant l'incubation, puis de Ni(II) pendant la migration, on observe des données similaires à la référence. Le sel imposé pendant l'incubation ne semble pas essentiel contrairement au Ni(II) mis dans le tampon de migration.

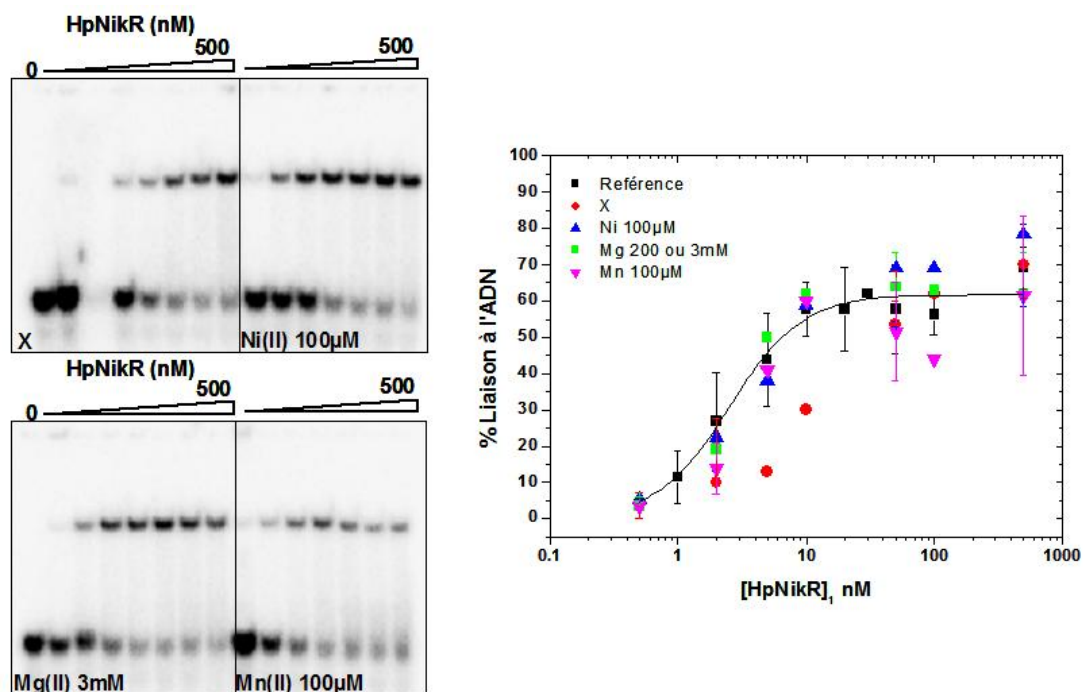


Figure IV.10 Effets des sels contenus dans le tampon d'incubation sur la liaison d'HpNikR sur *pureA32* lorsque du Ni(II) est ajouté dans le tampon de migration. HpNikR (0 ; 0,5 ; 2 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 et 500 nM) est mise à incuber avec 250 pM de *pureA32* en présence de dIdC à 1,5 μ g/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20 mM BisTris Borate pH7.4, 50 mM KCl, 2,5% Glycérol, 0,1% Triton et X : rien ou 100 μ M de NiCl_2 ou 3 mM MgCl_2 ou 100 μ M MnCl_2). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon (100 mM BisTris Borate pH7.4) contenaient 100 μ M de NiCl_2 .

En mettant 200 μ M de Mg(II) dans le tampon de migration au lieu du Ni(II), et tout autre paramètre étant équivalent pareillement, une liaison significative d'HpNikR à *pureA* est uniquement mesurée lorsque l'incubation a lieu en présence de Ni(II).

Le métal mis lors de la phase d'incubation est tout de même important : il permet d'activer en partie ou totalement la protéine. Le Mg(II) à basse concentration ne permet pas d'observer de liaison significative à l'ADN individuellement. Il tendrait à jouer un rôle additif à celui du Ni(II). Il permettrait de stabiliser le complexe pour qu'il soit visualisé en EMSA mais ne permet pas à lui seul la liaison à l'ADN (comparaison aux conditions d'anisotropie).

En présence d'un large excès de Mg(II) (3mM) dans le tampon de migration et en testant les différents sels métalliques dans le tampon de complexation, des retards sur gel sont observés dans les quatre conditions d'incubation. Ces données sont comparées à celles obtenues pour la détermination du Kd de liaison d'HpNikR à *pureA* en conditions NiMg/Ni (Figure IV.11).

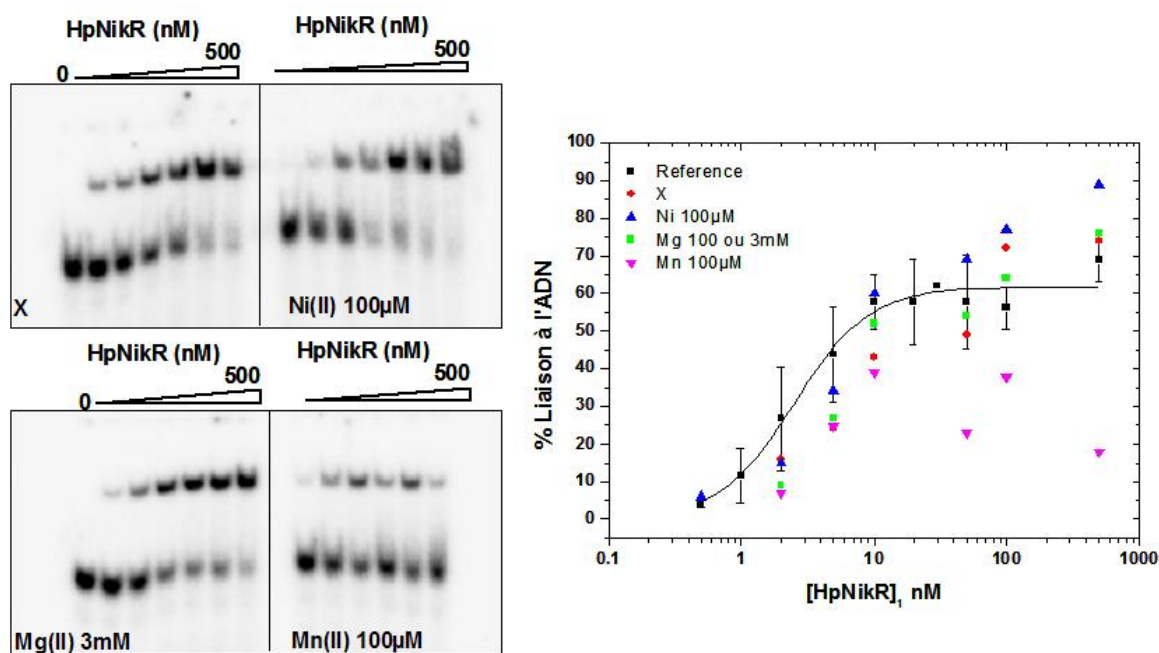


Figure IV.11 Liaison d'HpNikR sur *pureA*32 lorsque 3mM de Mg(II) sont ajoutés au tampon de migration. HpNikR (0 ; 0.5 ; 2 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 et 500nM) incubé avec 250pM de *pureA*32 en présence de dIdC à 1.5 μ g/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et X : rien ou 100 μ M de NiCl₂ ou 3mM MgCl₂ ou 100 μ M MnCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient 3mM de Mg(II).

Quelque soit la condition d'incubation, en présence d'un large excès de Mg(II) en migration (3mM), des retards sur gel similaires à ceux observés pour la référence (NiMg/Ni) sont obtenus. Ce comportement est surprenant mais reproductible. Cela signifierait que le Mg(II) soit allé dans le site de haute affinité, si ce dernier est l'unique responsable de la liaison à l'ADN, mais que l'affinité pour ce site HA particulier serait très faible pour ce métal **ou/et**

qu'il ait déplacé les équilibres des conformations adoptables par la protéine et favorisé la liaison à l'ADN. Pour cette seconde hypothèse mécanistique, le Mg(II) pourrait métalliser des sites secondaires de plus basse affinité qui stabilisent une conformation (site équivalent au site à K^+ chez EcNikR, site externe mis en évidence dans la structure RX...). Le Mg(II) à haute concentration n'aurait plus de caractère « additif » et permettrait de stabiliser le complexe pour qu'il soit visualisé en EMSA.

En présence de 100 μ M Mn(II) dans le tampon d'incubation et de migration (Figure IV.12), la liaison d'HpNikR à *pureA* et à *pnixA* est similaire à la référence (NiMg/Ni). La liaison est de 100%. Le K_d de liaison à *pureA32* et *pnixA32* serait largement inférieur à 50nM. Le Mn(II), tout comme le Ni(II) ou le Mg(II) à haute concentration permet d'activer la protéine.

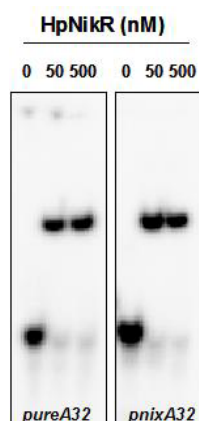


Figure IV.12 Liaison d'HpNikR sur *pureA32* et *pnixA32* en présence de 100 μ M de Mn(II) dans le tampon d'incubation et de migration. HpNikR (0 ; 50 et 500nM) incube avec 250pM d'ADN en présence de dIdC à 1.5 μ g/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100 μ M Mn(II)). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient 100 μ M de Mn(II).

Les sels métalliques (et leur concentration) imposés pendant la migration en EMSA semblent importants, ils faciliteraient la complexation à l'ADN d'HpNikR pré-métallée ou non et stabiliseraient les complexes pouvant être formés en incubation en métallant un potentiel second site. L'influence des sels de migration n'est pas dépendante d'une classe d'ion métallique (Mg(II) et Mn(II) : métal dur et Ni(II) : métal « intermédiaire »). Ce site doit donc présenter des ligands plutôt favorables à la métallation par ces différents cations. Si le potentiel second site métallique était constitué majoritairement d'histidines une différence de comportement (K_{dADN}) aurait été observée lors des activations par le Ni(II) ou le Mg(II).

Si ce site avait compris des thiols dans sa sphère de coordination, une signature en UV-Vis aurait été notée au-delà de 1 équivalent de métal ajouté.

Il est de ce fait probable que les ligands coordinateurs des cations dans ce site potentiel soient des ligands oxygénés de type carboxylate.

La conformation de liaison d'HpNikR métallée à l'ADN ne doit pas changer selon les sels métalliques, sinon les affinités observées varieraient et la stoechiométrie de liaison pourrait en être affectée.

IV.1.7. Discussion

Nous avons étudié la liaison d'HpNikR aux séquences opératrices des promoteurs *pureA* et *p_{nixA}* en utilisant deux techniques : l'EMSA et l'anisotropie de fluorescence. Dans les deux cas, une complexation de la protéine métallée respectant une stoechiométrie de liaison 1:1 a été notée (*pureA* : EMSA/Anisotropie ; *p_{nixA}* : EMSA). Les essais préliminaires de co-cristallisation ADN-Ni-Protéine se sont révélés peu concluants, seule la protéine apo cristallise. Cependant, les séquences d'ADN testées pour ces essais étaient à bouts francs ; des essais avec des oligonucléotides à bouts cohésifs pourraient être intéressants pour essayer de favoriser l'agencement des ADN les uns par rapport aux autres. Par ailleurs, il serait intéressant de tester des oligonucléotides légèrement plus longs en tenant compte des dernières données d'empreintes décrites par Benanti *et al.* (Figure IV.6) et des variations de K_d que nous avons mesurées en EMSA.

Des effets de bord pourraient avoir lieu ou alors des interactions supplémentaires de la protéine avec les bases présentes en bordure des séquences de 32pb seraient mises en jeu sur les séquences de 40 et 43 pb. Dernièrement il a été proposé que l'extension N-ter (Nt9) d'HpNikR (9 résidus dont 3 aspartates et 1 lysine) pourrait augmenter la spécificité de liaison d'HpNikR à l'ADN en interagissant ce dernier. En effet, une délétion de ce motif accroît l'aspécificité de liaison et étonnamment augmente l'affinité de Δ Nt9-HpNikR pour l'ADN (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007). Les variations de K_d que nous mesurons selon la taille des oligonucléotides pourraient refléter une perte d'interaction entre les extrémités N-ter d'HpNikR et l'ADN.

D'après un modèle de liaison d'HpNikR sur une séquence de 32pb avec le motif de reconnaissance 7-11-7 (Dian, 2007) (Figure IV.13), les feuillets β des domaines de liaison à l'ADN interagiraient moins spécifiquement avec le sillon principal de l'ADN en comparaison à ceux d'EcNikR dans le complexe EcNikR-Ni-ADN (Schreiter *et al.*, 2006). Les extensions N-ter (simulation du positionnement), quant à elles, interagiraient plus spécifiquement avec le sillon principal de la séquence opératrice.

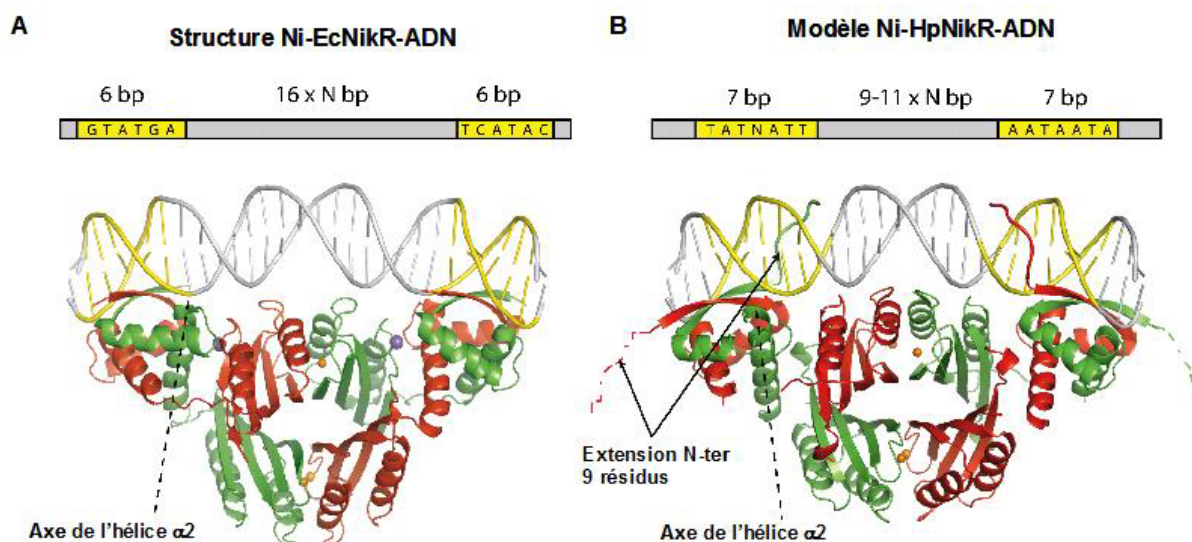


Figure IV.13 Modèle de liaison de Ni-HpNikR sur une séquence opératrice de 32pb riche en AT comparée à la structure du complexe Ni-EcNikR-ADN (Dian, 2007). Les sous unités monomériques constituant une unité dimérique sont colorés en rouge et en vert. Les motifs reconnus par la protéine sur l'ADN sont précisés en jaune. Le Ni(II) du site de haute affinité et le K⁺ du site de basse affinité (chez EcNikR) sont précisés en orange et en violet respectivement. Ce modèle montre que la plus longue boucle de jonction interdomaine chez HpNikR couplée à l'absence d'un site de basse affinité chez HpNikR permettrait au domaine de liaison à l'ADN d'adopter une orientation différente par rapport à celui d'EcNikR. Cette orientation permet aussi à une extension N-ter de se lier à l'ADN au niveau du sillon principal. Le modèle Cis Ni-HpNikR a été construit sur le même principe que le modèle Cis Ni-PhNikR (Chivers & Tahirov, 2005) soit en échangeant le positionnement de deux sous unités monomériques en considérant la structure Ni1-HpNikR (Dian et al., 2006).

Deux extensions sur les quatre interagiraient avec la séquence d'ADN. *A priori*, dans nos conditions expérimentales et si le modèle est juste, HpNikR devrait se lier spécifiquement à *pureA32* et à *pnixA*. Cependant les deux extensions N-ter non positionnées sur ce modèle pourraient interagir avec l'ADN, ou avec la protéine ou rester libre. Nous ne pouvons donc pas exclure que les séquences *pureA32* et *pnixA32* soient trop courtes.

Nous avons également montré que selon la technique employée, les excès relatifs de métaux à ajouter variaient pour observer une liaison. Les principales conditions métalliques testées dans notre étude ont été récapitulées dans le [Tableau IV-1](#).

En anisotropie de fluorescence, HpNikR se lie à *pureA40-Fl* en présence uniquement de Ni(II), alors qu'il avait été proposé que cette liaison ne pouvait pas avoir lieu sans qu'un second métal (Mg(II), Ca(II), ou Mn(II) et pas du Ni(II)) ne soit ajouté (Dosanjh *et al.*, 2007). Cette différence de résultat pourrait venir de la différence de longueur de l'oligonucléotide ou du fait du positionnement différent de la sonde fluorescente utilisée. En effet, dans leurs travaux, la fluorescéine est centrale. Sa présence pourrait perturber la stabilité du complexe soit en engendrant une gêne stérique soit en perturbant des interactions non spécifiques entre le domaine de tétramérisation et l'ADN comme cela a été observé pour le complexe EcNikR-

Ni-ADN (Schreiter *et al.*, 2006) (interactions des résidus K64-R65 et les phosphates [Figure I.29](#) p- 76 -). La présence de sels supplémentaires pourrait alors augmenter la stabilisation du complexe dans ces conditions.

Technique	Séquence	Conditions métalliques (sels)		Liaison
		Complexation	Migration	
EMSA	<i>pnixA32</i>	Ni 100µM et Mg 3mM	Ni 100µM	Kd : 1,7 nM
	<i>pnixA43</i>			Kd ~ 5nM
	<i>pureA32</i>			Kd : 2,5 nM (=Référence)
	<i>pureA40</i>			Kd ~15nM
	<i>pureA32</i>	0	0	Aucune liaison
		Ni 100µM	0	
		Ni 100µM et Mg 3mM	0	
		Ni 100µM	Ni 100µM	Idem à la Ref
		0	Ni100µM	
		Mn 100µM	Mn 100µM	
		0	Mn 100µM	
		Mg 3mM	Mg 3mM	
		0	Mg 3mM	
		Ni 100µM	Mg 200µM	Liaison significative
		Mg 200µM	Mg 200µM	Pas de liaison
		0	Mg 200µM	significative
Anisotropie	<i>pureA40-Fl</i>	Ni 100µM	0	Liaison
		Ni 100µM et Mg 3mM	0	

Tableau IV-1 Récapitulatif des techniques, des séquences et des principales conditions métalliques employées pour étudier la liaison d'HpNikR sur *pureA* et *pnixA*.

En EMSA, nous avons montré que la liaison d'HpNikR à *pureA* ne peut être mesurée qu'en présence d'un large excès de métal dans le tampon de migration (Ni(II) à 100µM, Mg(II) à 3mM ou Mn(II) à 100µM). Cette liaison est indépendante de la nature des métaux testés. Ces larges excès métalliques sont suffisants pour « activer » la protéine et permettre une liaison à l'ADN de cette dernière en favorisant la formation d'un complexe (métallation complète du site de haute affinité) et/ou en le stabilisant (métallation de site interdomaine protéique ou métallation inter molécule ADN/Protéine).

Un cation en excès comme le Mg(II) pourrait être lié dans le site équivalent au site à K⁺ chez EcNikR (Schreiter *et al.*, 2006) ou à Ni(II) chez PhNikR (Chivers & Tahirov, 2005) du fait de sa richesse en oxygène et stabiliser une conformation « cis fermée » de la protéine.

Il pourrait être également lié au site « externe » présent à l'embouchure des sites de haute affinité ou encore à l'extension en N-ter pour jouer un rôle de « neutralisateur » des aspartates ou pour favoriser une conformation pour permettre des interactions entre la protéine et

l'ADN. La liaison du métal pourrait être directe ou mixte avec une coordination du Mg(II) entre l'ADN et les résidus aspartates de la protéine.

Les études faites par les groupes de S. Michel (Dosanjh *et al.*, 2007) et P. Chivers (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007) suggèrent que le cation « additionnel » influencerait la liaison d'HpNikR à l'ADN *via* l'extension N-ter qui comprend des ligands durs (aspartate).

Benanti *et al.* ont observé qu'HpNikR WT pouvait se lier à *pnixA* et à *pureA* en EMSA en présence uniquement d'un large excès de Ni(II) ou de Mg(II) dans le tampon de migration. Lorsque l'extrémité N-ter était délétée, Δ Nt9-HpNikR pouvait se lier à *pnixA* en présence d'un excès de métal en migration mais aussi en absence. Par contre Δ Nt9-HpNikR ne pouvait se lier à *pureA* qu'en présence d'un excès de métal. L'extension N-ter n'aurait pas la même influence sur la liaison d'HpNikR selon la séquence opératrice. Il semblerait que la liaison d'HpNikR à *pnixA* cation-dépendante, soit dépendante des résidus aspartates 7 et 8 (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007). Cette différence de comportement laisse envisager qu'une différence au niveau des séquences à lier existe, cependant elle n'est pas évidente (Figure IV.14).

Séquence opératrice de *pureA*

```

5' - (-95) TTCAAGATATAACACTAATTTCATTTTAAATATAATTAGTTTAAATGAACG (-46) -3'
3' - AAGTTTCTATATTGTGATTAAGTAAAATTTATTATTAATCAATTACTTGC -5'

```

Séquence opératrice de *pnixA*

```

5' - (-17) AACAAATATTATTACAATTACCAAAAAGTATTATTTTTTTAAAGGT (+30) -3'
3' TTGTTTTATATAATGTTAATGGTTTTTTCATAATAAAAAGAATTTTCCA -5'

```

Figure IV.14 Séquences opératrices liées par HpNikR pour réguler la transcription des gènes *ureAB* et *nixA*. Les régions protégées sur ces séquences par HpNikR ont été identifiées par des empreintes à la DNaseI et précisées entre crochets. Les demi-motifs reconnus par HpNikR sont en gras (6-13-6) (Benanti & Chivers, 2007). Les motifs sont légèrement différents de ceux considérés pour définir le consensus (7-11-7) (Ernst *et al.*, 2006).

Par ailleurs ils ont observés que les délétions individuelles des résidus E39 et D43 (résidus équivalents du site à K⁺ chez EcNikR) ne modifiaient pas le comportement de liaison à *pnixA* d'HpNikR (Benanti & Chivers, 2007). Le cation ne se lierait donc pas dans ce site, il ne serait pas conservé entre les différentes protéines. Il serait tout de même intéressant de s'assurer de l'absence d'effet de cette mutation sur la liaison à *pureA* dans la mesure où l'influence de l'extension N-ter dans le « recrutement » des cations n'est pas la même sur les séquences *pureA* et *pnixA*. Le comportement d'HpNikR pour sa liaison à l'ADN tend à varier selon la séquence mais aussi les métaux mis en présence.

L'effet stabilisateur que nous proposons pour les cations est en accord avec les données de la littérature. Maintenant aucune de nos données ne nous permet d'affirmer le positionnement de ce métal stabilisateur. Des études complémentaires avec la forme $\Delta Nt9$ -HpNikR seraient nécessaires. Il serait également intéressant de s'assurer du positionnement relatif des deux extensions N-ter d'un domaine de liaison à l'ADN par rapport à l'ADN.

Un schéma récapitulatif du mode d'action hypothétique d'HpNikR pour se lier à *pureA* et *pnixA* peut être proposé à partir de nos données (Figure IV.15).

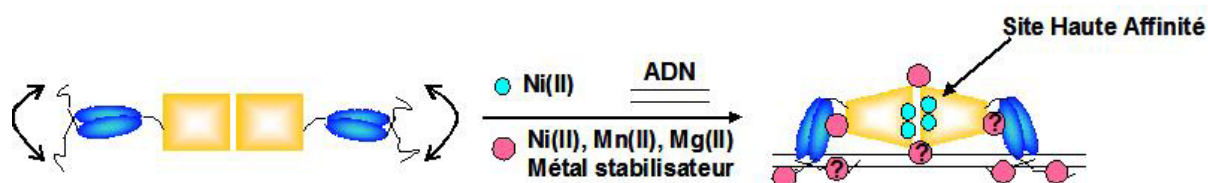


Figure IV.15 Mode d'activation d'HpNikR pour la liaison sur *pureA* et *pnixA*. HpNikR peut être activée avec du Ni(II), du Mn(II) ou dans une moindre mesure par du Mg(II). La localisation du site stabilisateur est indéfinie.

D'après nos observations, et sous réserve de la résolution des structures cristallographiques des complexes HpNikR/ADN, nous pensons que le mode d'action d'HpNikR (activation ou répression de la transcription) n'est pas dépendant de la nature du complexe (affinité de la protéine métallée pour ses séquences opératrices, stoechiométrie de liaison, activation par les mêmes métaux). Le mode de régulation différentielle dépendrait plutôt du positionnement relatif de la séquence opératrice par rapport au promoteur. Pour qu'HpNikR puisse activer l'expression des gènes *ureAB*, il est possible qu'une interaction entre l'ARN polymérase et la protéine métallée soit nécessaire (Activation par un mécanisme de classe I). Cette interaction pourrait être établie entre les extensions N-ter d'HpNikR et la sous unité α_C de l'enzyme.

Il serait intéressant de mettre en place un test pour visualiser ou non une interaction entre l'enzyme et la protéine dans le cadre d'un complexe ternaire (ADN/HpNikR-Ni/ARN pol) ou de mesurer l'activité de l'ARN polymérase en présence d'HpNikR sauvage et $\Delta Nt9$.

IV.2. La liaison sur les motifs *NiFu* et *nikRS2* de la région intergénique : *nikR-exbB*

IV.2.1. Objectif de l'étude

Comme cela a été montré dans l'introduction, HpNikR réprime l'expression transcriptionnelle du gène *nikR* ainsi que des gènes de l'opéron *exbB-exbD-tonB* en fonction du nickel (Contreras *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2006). Ces gènes se présentent sous la forme d'opérons divergents.

En 2003, il a été montré qu'HpNikR liait une séquence palindromique similaire à celle d'EcNikR pour s'autoréguler (Contreras *et al.*, 2003). Cependant ce résultat a été remis en cause en 2005. Il a été montré par des empreintes à la DNaseI qu'HpNikR ne liait pas ce motif mais plutôt une région notée dans mon étude *NiFu* (-27 à +10 par rapport au TSP) chevauchant le promoteur *pnikR* (Delany *et al.*, 2005).

Cependant il est à noter que la majorité du travail de Delany *et al.* a été réalisée avec une protéine issue d'une fusion taggée tronquée présentant 3 résidus supplémentaires (GSH) en N-ter. Nous noterons cette protéine GSH-HpNikR car la différence entre les deux protéines pourra avoir son importance vu la fonction du N-ter dans la réactivité HpNikR.

Il a également été montré que HpNikR liait une région notée dans mon étude *nikRS2* (-37 à +1 par rapport au TSP) chevauchant le promoteur *pexbB* (Figure IV.16).

HpNikR lie ces deux séquences en présence d'un excès métal (100µM de nickel ou de manganèse).

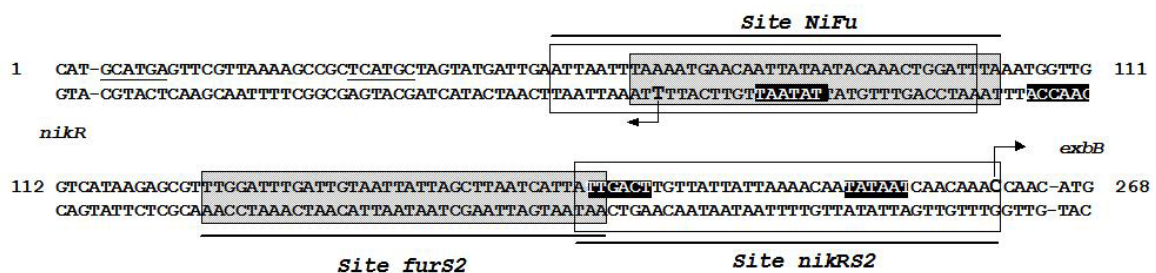


Figure IV.16 Liaison de HpNikR et HpFUR sur la région intergénique au niveau des promoteurs de *pnikR* et *pexbB* (schéma inspiré de (Delany *et al.*, 2005)). Le +1 de transcription est indiqué par une flèche. Les boîtes -35 et -10 sont surlignées en noir. Les zones protégées par HpFUR ou par HpNikR ont été déterminées par des empreintes à la DNaseI faites sur un seul brin d'ADN. La zone de protection sur le second brin a donc été extrapolée. Les zones protégées par HpNikR sont délimitées par le cadre ouvert (*NiFu* et *nikRS2*). Les zones protégées par HpFUR sont délimitées par le cadre grisé (*NiFu* et *furS2*). Le motif de liaison prédit par Contreras *et al.* pour HpNikR par analogie à celui de EcNikR est souligné. Le site *NiFu* désigne la région protégée par HpNikR et HpFUR sur *pnikR*. Les sites *nikRS2* et *furS2* désignent les régions protégées par HpNikR et HpFUR sur *pexbB* respectivement.

La séquence utilisée pour les gels retard faits en 2003 (Contreras *et al.*, 2003), pour étudier la liaison d'HpNikR au motif prédit, présentait non seulement le motif prédit mais également le motif *NiFu* décrit par Delany *et al.* Plusieurs complexes ADN/Protéine ont été observés au-delà de 1,5µM de protéine en présence de 50µM de Ni(II). HpNikR était donc en mesure de lier plusieurs motifs ou alors de s'agréger à l'ADN.

En 2006, une troisième étude (Abraham *et al.*, 2006) s'est également intéressée à la liaison d'HpNikR sauvage sur son motif prédit, de nouveau une séquence présentant les deux motifs a été utilisée. Un unique retard sur gel a été observé pour des concentrations protéiques supérieures à 10µM et un excès en Ni(II) de 800µM.

La liaison d'HpNikR sur sa séquence opératrice est sujette à discussion, nous avons donc cherché à la mesurer en utilisant 2 techniques (Gel retard et un test nucléase construit pour cette étude).

Par ailleurs lors de leur étude Delany *et al.* ont montré que HpFUR, le métallorégulateur de l'homéostasie du fer chez *H. pylori*, pouvait non seulement lier une séquence opératrice chevauchant *pnikR* (site *NiFu*) mais aussi une séquence opératrice qui chevauche très partiellement *pexbB* (site *furS2*) en présence de nickel et de manganèse (Delany *et al.*, 2005). Ces données ont permis de mettre en évidence une régulation croisée entre les deux principaux métallorégulateurs d'*H.pylori* en fonction de la disponibilité en ion métallique. Nous nous sommes donc intéressés à cette hypothétique régulation entre ces deux métallorégulateurs. La liaison individuelle d'HpNikR et d'HpFUR sur cette région a dans un premier temps été caractérisée avant que des tests de compétition ne puissent être faits.

Une première caractérisation de la liaison d'HpNikR sur les séquences isolées *NiFu* et *nikRS2* a été faite par EMSA afin d'en déterminer son affinité en fonction des conditions métalliques imposées.

IV.2.2. Choix des séquences oligonucléotidiques

Les séquences oligonucléotidiques testées pour étudier la liaison d'HpNikR sur les sites *NiFu* et *nikRS2* en EMSA sont précisées ci dessous.

Séquence *NiFu* (47pb)

F1-5' CCTTTAAATCCAGTTTG**TATTATA**ATTGTTTCATTT**TAAATTA**ATTCC 3'
3' GGAAATTTAGGT**CAAACATA**ATATTAACAAG**TAAAAT**TTAATTAAGG 5'

Séquence *nikRS2* (44pb)

F1-5' GGTATTGACTTGTT**TATTATT**AAAACAATATA**ATCAACA**AACCGG 3'
3' CCATAACTGA**ACAATAA**TATTTTGTAT**TATTAGT**TGTTTGGCC 5'

Les deux séquences présentent en 5' et en 3' des bases aspécifiques supplémentaires (soulignées) pour stabiliser les duplex. Elles présentent également sur une extrémité 5' un fluorophore (fluorescéine) pour les mesures d'EMSA en fluorescence.

Les demi-motifs proposés comme étant reconnus par HpNikR sont en gras (Delany et al., 2005; Ernst et al., 2006)

IV.2.3. Affinité d'HpNikR pour *NiFu* et *nikRS2*

IV.2.3.1. EMSA révélation en fluorescence

Dans un premier temps, des gels EMSA où l'ADN était marqué en 5' par la fluorescéine ont été réalisés afin de déterminer la gamme de concentration pour laquelle la liaison d'HpNikR sur p*NiFu* et p*nikRS2* est observée. Ces premiers essais ont été faits dans des conditions où la liaison totale est mesurée (absence d'ADN compétiteur) et en présence d'un large excès de Ni(II) (100µM) (Figure IV.17).

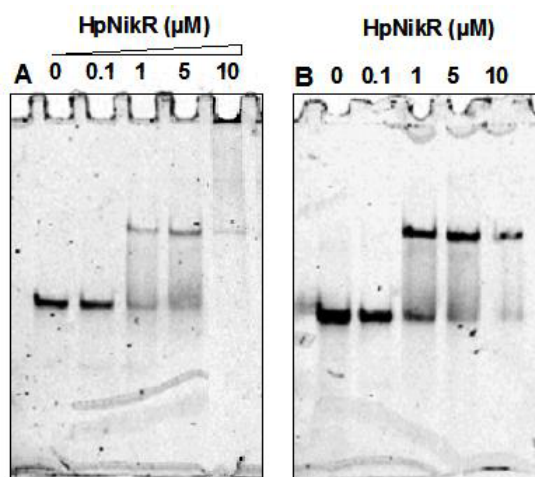


Figure IV.17 Liaison d'HpNikR à l'ADN (A : *NiFu* – B : *nikRS2*) en présence d'un excès de Ni(II) mesurée en fluorescence. HpNikR est incubée avec 100 nM d'ADN en présence de 100µM de NiCl₂. Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 7% ; le gel et le tampon contenaient du NiCl₂ à 100µM.

Quelque soit la séquence d'ADN, *NiFu* ou *nikRS2*, des retards sur gel sont observables pour une concentration en protéine égale ou supérieure à 1µM (50% de liaison). Les retards sur gel des complexes correspondent à des complexes Protéine:ADN de 1:1. Pour des concentrations supérieures à 5µM de protéine, une perte du signal de l'ADN est observée. En raison de ces propriétés d'agrégation, HpNikR dans ces conditions expérimentales est en mesure de s'agréger. Il est probable que la protéine agrégée se soit liée ou alors ait piégé l'ADN spécifique aboutissant à la formation de complexe ADN/Protéine qui ne puisse pas pénétrer dans le gel. Par ailleurs, les gels ont été réalisés en absence d'ADN compétiteur. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la disparition de l'ADN marqué en particulier de *NiFu*. Les

expériences de gel retard, qui ont suivi, ont été réalisées en présence d'ADN compétiteur (poly dIdC) à 1.5µg/mL, et en utilisant des séquences d'ADN marquées en 5' par du ^{32}P (meilleure sensibilité).

IV.2.3.2. EMSA révélation en radioactivité

Des gels retard ont été réalisés avec HpNikR sur les séquences *NiFu* et *nikRS2* en présence d'un excès de nickel (100µM dans le tampon d'incubation et de migration, conditions notées NiNi) et d'ADN compétiteur (Figure IV.18).

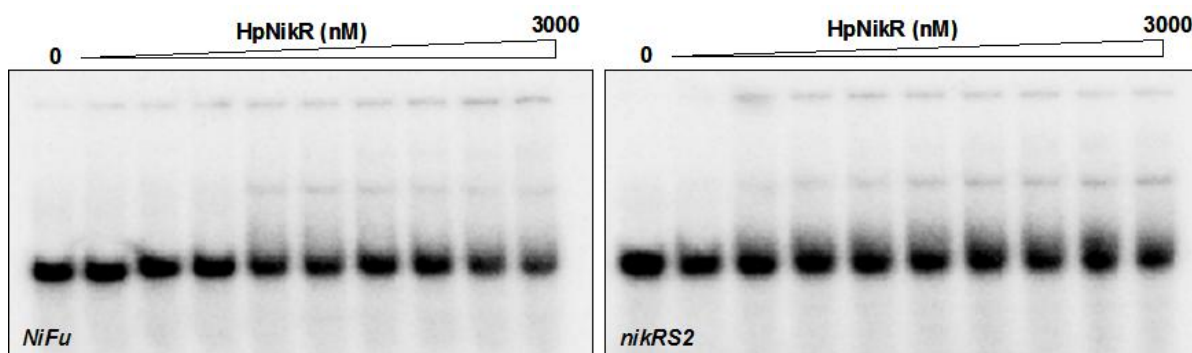


Figure IV.18 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* - *nikRS2*) en présence d'un excès de Ni(II) dans le tampon de complexation et de migration. HpNikR (0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 350 ; 700 ; 1000 et 3000 nM) incubé avec 500pM d'ADN en présence de dIdC à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100µM de Ni(II)). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du NiCl₂ à 100µM. Une perte moyenne de 10% de la radioactivité totale est observée.

De façon inattendue et reproductible, quelque soit la séquence considérée, moins de 10% de complexe ADN/Protéine est observé pour les concentrations les plus importantes d'HpNikR (3µM). Ce résultat est surprenant si l'on considère les données obtenues en EMSA fluorescent. Cependant dans ces expériences il n'y avait pas d'ADN compétiteur. La liaison observée pouvait être en partie aspécifique.

La liaison d'HpNikR à l'ADN en présence d'un excès de Ni(II) a toutefois été observée sur les séquences *pureA* et *pnixA* dans une même gamme de concentration de protéine^{**}. Ce comportement serait alors séquence dépendante. L'affinité d'HpNikR pour ces deux séquences (*NiFu* et *nikRS2*), en présence uniquement de Ni(II), serait très faible ($K_d > 3\mu\text{M}$). Ce résultat est en désaccord avec les données observées par Delany *et al.*. En effet en footprint, 400nM de protéine suffisent pour observer une protection significative de l'ADN en présence de 100µM de Ni(II) (Delany *et al.*, 2005).

^{**} Lors de migration de commune, cette différence de liaison est confirmée.

Cette protéine, toutefois, possède en son extrémité N-ter, 3 résidus supplémentaires (GSH) susceptibles de modifier le comportement de liaison à l'ADN (affinité). Cependant cette même protéine a été employée pour déterminer la région protégée par HpNikR en amont de *pureA* (Delany et al., 2005). La zone protégée par GSH-HpNikR est similaire à la protéine sauvage. L'effet du tag semble minime sur la liaison à *pureA*. La liaison a été mesurée par des empreintes à la DNaseI en présence des trois motifs *NiFu*, *nikRS2* et les motifs prédits. La présence de ces trois motifs pourrait éventuellement influencer la liaison (synergie des séquences).

Nos résultats sont également en désaccord avec des données plus récentes où il a été montré qu'HpNikR sauvage se liait sur une séquence contenant le motif *NiFu* ainsi que le motif prédit en présence de 50 μ M de Ni(II) avec un K_d de 120 nM \pm 50 (Benanti & Chivers, 2007). Un complexe de liaison à l'ADN serait observé (Figure IV.19). Cependant le gel d'EMSA montré dans la publication est discutable puisque aucun retard n'est visible. Une perte de la radioactivité est notable pour des concentrations de l'ordre du micromolaire et pourrait être dépendante de l'agrégation de la protéine comme dans notre cas. Ces données sont peu convaincantes.

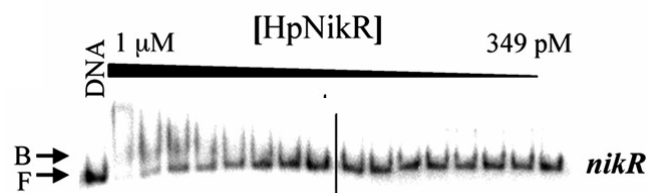


Figure IV.19 Liaison d'HpNikR à *pnikR* mesurée en EMSA en présence de 50 μ M de NiCl₂. F précise le niveau de migration de l'ADN libre et B précise le niveau de migration de la fraction d'ADN lié. Gel extrait de (Benanti & Chivers, 2007)

La seconde condition expérimentale employée par Delany et al. dans son étude pour observer la liaison d'HpNikR à *NiFu* et à *nikRS2*, soit un excès de 100 μ M de Mn(II) (conditions MnMn), a été testée.

Dans ces nouvelles conditions, des retards sur gel ont été observés (Figure IV.20).

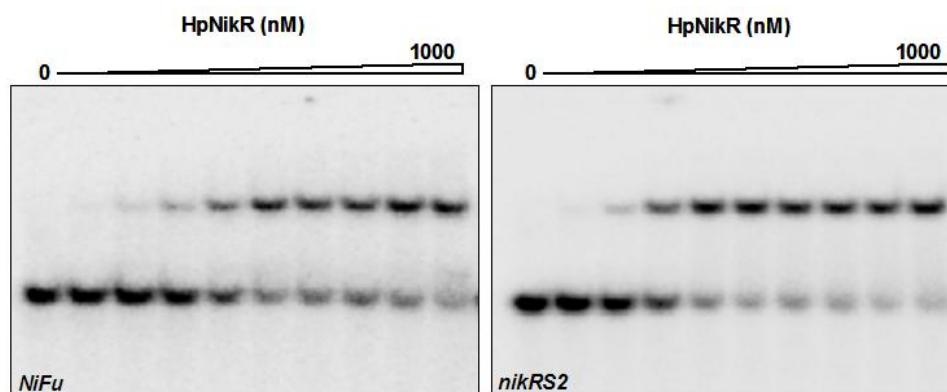


Figure IV.20 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* _ *nikRS2*) en présence de 100 μ M de Mn(II) dans le tampon de complexation et dans le tampon de migration. HpNikR (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 et 1000 nM) incubé avec 500pM d'ADN en présence d'ADN compétiteur à 1.5 μ g/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100 μ M de MnCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du MnCl₂ à 100 μ M.

La liaison maximale d'HpNikR à l'ADN (B_{max}) est en moyenne de 65% bien que le système soit saturé (plateau). Une perte moyenne de 10% de la radioactivité totale est observée pour des concentrations supérieures à 50nM, cette perte peut aller jusqu'à 30% pour des concentrations supérieures à 300nM. Ces pertes peuvent être corrélées à une éventuelle agrégation de la protéine bien qu'aucune radioactivité n'ait été mesurée dans les puits.

Le K_d de liaison d'HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2* a pu être déterminé en utilisant un modèle simple où $A + B \leftrightarrow AB$.

La résolution de l'équation quadratique (cf. Annexe C) a permis d'ajuster les données expérimentales (Figure IV.21). Il a été considéré dans ces conditions que la totalité de la protéine était métallée.

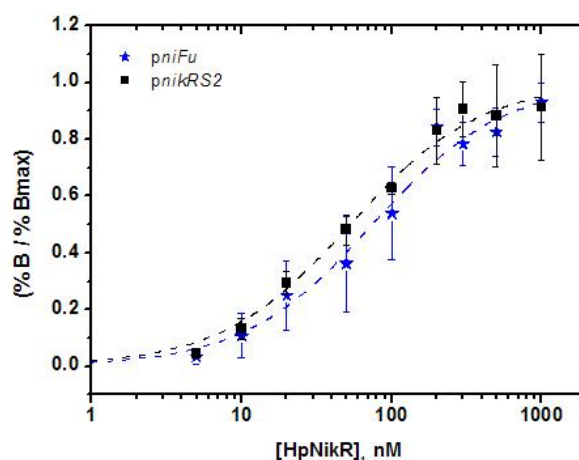


Figure IV.21 Liaison d'HpNikR sur *NiFu* (★) et *nikRS2* (■) en présence de 100 μ M de MnCl₂. 5 jeux de données ont été traités pour chaque séquence. Les courbes représentent l'ajustement obtenu par résolution de l'équation quadratique. $K_{d_{NiFu}} = 74 \text{ nM} \pm 8$ et $K_{d_{nikRS2}} = 53 \text{ nM} \pm 4$.

HpNikR lie *NiFu* avec une constante de dissociation apparente de 74 nM et *nikRS2* avec une constante de dissociation apparente de 53 nM en présence d'un excès de Mn(II). Aucune coopérativité ne semble être mise en jeu dans cette condition à la différence des liaisons observées sur *pureA* et *pnixA*.

L'observation de la liaison à l'ADN par HpNikR en présence de cet excès est en accord avec les travaux réalisés par Delany et *al.* bien qu'aucune allusion à l'agrégation de la protéine ne soit faite, ni même visualisée sur les empreintes à la DNaseI réalisées.

HpNikR lierait *NiFu* et *nikRS2* en présence uniquement de manganèse mais ne pourrait pas lier ces deux séquences en présence uniquement de nickel.

De nouvelles conditions métalliques ont été testées afin d'essayer de comprendre cette spécificité ionique inattendue et sont répertoriées dans le Tableau IV-2. Les gels équivalents à certaines des conditions testées ont été mis en Annexe C.

Deux phases d'exposition aux sels métalliques sont à considérer dans les expériences de retard sur gel. Dans un premier temps, la protéine est mise à incuber avec l'ADN dans un tampon de complexation comprenant une concentration en sels métalliques donnée, puis le mélange réactionnel est mis à migrer dans un tampon de migration ayant une composition en sels métalliques variable.

Incubation Migration	Mg(II) 3mM			
	Rien	Ni(II) 100µM	Mn(II) 100µM	Co(II) 100µM
Rien	Pas de liaison	Pas de liaison	Pas de liaison	×
Ni(II) 100µM	Pas de liaison	Pas de liaison	Pas de liaison	×
Mn(II) 100µM	Liaison sur <i>pnifu</i> et <i>pnikRS2</i>	Liaison <i>Kdnifu</i> : 38nM <i>KdnikRS2</i> : 24nm	Liaison <i>Kdnifu</i> : 74nM <i>KdnikRS2</i> : 53nm	×
Co(II) 100µM	×	Liaison sur <i>pnifu</i> et <i>pnikRS2</i>	×	Liaison sur <i>pnifu</i> et <i>pnikRS2</i>
Mg(II) 3 mM	Pas de liaison sur <i>nikRS2</i>	Pas de liaison sur <i>nikRS2</i>	Pas de liaison sur <i>nifu</i>	×

Tableau IV-2 Conditions expérimentales testées pour étudier la liaison à l'ADN d'HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2*. Les croix correspondent aux conditions non testées. Le magnésium dans le tampon de complexation est utilisé pour saturer des sites aspécifiques sur l'ADN susceptible de lier du métal. Pour les conditions où seul du Mg(II) était présent en migration, la liaison n'a été testée que sur une séquence sinon la liaison a été sur les deux séquences.

La liaison sur *pNiFu* et *pnikRS2* d'HpNikR en présence d'un excès de manganèse pendant la migration a également été observée dans deux autres conditions :

- Lorsque la protéine est mise à incuber avec l'ADN en absence de métal.

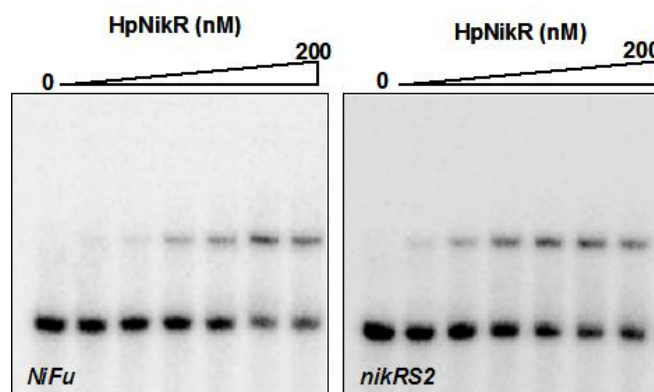


Figure IV.22 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* _ *nikRS2*) en présence de Mg(II) en incubation et en présence de 100µM de Mn(II) dans le tampon de complexation et de migration. HpNikR (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200) incube avec 500pM d'ADN en présence d'ADN compétiteur à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton 100X et 100µM de MnCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du MnCl₂ à 100µM.

- Lorsque la protéine est mise à incuber avec l'ADN en présence de Ni(II).

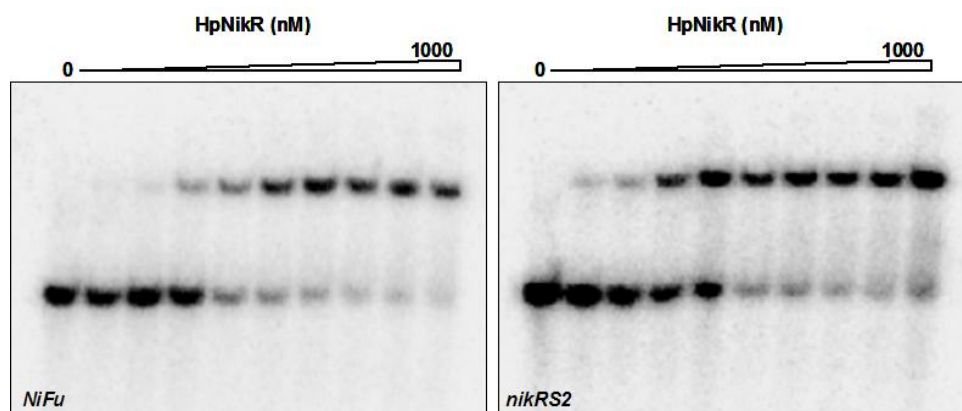


Figure IV.23 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* _ *nikRS2*) en présence de 100µM de NiCl₂ dans le tampon de complexation et de 100µM MnCl₂ dans le tampon de migration. HpNikR (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 et 1000 nM) incube avec 500pM d'ADN en présence d'ADN compétiteur à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100µM de MnCl₂). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du MnCl₂ à 100µM.

Dans cette deuxième condition, les K_d de liaison d'HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2* ont été déterminés en utilisant de nouveau le même modèle simple où $A + B \leftrightarrow AB$ et en résolvant l'équation quadratique.

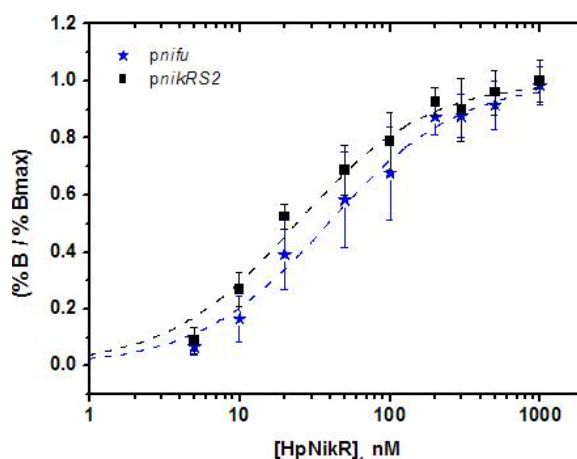


Figure IV.24 Liaison d'HpNikR sur *NiFu* (★) et *nikRS2* (■) après une incubation en présence d'un excès de Ni(II) et une migration en présence d'un excès de Mn(II). 5 jeux de données ont été traités pour chaque séquence. Les carrés représentent les données expérimentales, les courbes représentent le fit obtenu par résolution de l'équation quadratique. $Kd_{NiFu} = 38 \text{ nM} \pm 3$ et $Kd_{nikRS2} = 24 \text{ nM} \pm 2$.

La liaison maximale d'HpNikR à l'ADN (Bmax) dans ces conditions est en moyenne de 80% bien que le système soit saturé. Une perte moyenne de 10% de la radioactivité totale est observée pour des concentrations supérieures à 100nM, cette perte peut aller jusqu'à 30% pour des concentrations supérieures à 300nM. Ces pertes peuvent de nouveau être corrélées à une éventuelle agrégation de la protéine.

HpNikR lie *pNiFu* avec une constante de dissociation apparente de 38 nM et *pnikRS2* avec une constante de dissociation apparente de 24 nM en conditions NiMn. De nouveau, aucune coopérativité n'est observée. L'affinité de la protéine pour l'ADN dans les conditions NiMn est augmentée d'un facteur 2 par rapport aux conditions MnMn. Le nickel aurait alors un effet « synergique » de l'effet du Mn(II) pour la liaison à l'ADN.

Lors de l'étude de la liaison d'HpNikR sur *pureA* et *pnixA*, il a été noté que cette dernière pouvait être activée par un large excès de Mg(II). Nous avons donc regardé s'il en était de même pour la liaison sur *NiFu* et *nikRS2*. Pour cela l'excès de Mn(II) en migration a été remplacé par un excès de Mg(II) à 3mM. Il s'avère que dans cette condition, HpNikR ne se lie pas à *nikRS2*. Aucune liaison d'HpNikR à l'ADN n'est observée après incubation et migration de la protéine et de l'ADN avec du Ni(II) ou du Mg(II) aux concentrations étudiées (Tableau IV-2 et annexe C). Le Mg(II) ne jouerait pas le même rôle que le Mn(II), il n'a aucun effet sur la liaison d'HpNikR sur ces séquences. L'effet potentiel du Mg(II) (Benanti & Chivers, 2007; Dosanjh *et al.*, 2007) qui a été proposé pour expliquer la liaison d'HpNikR à *pureA* et à *pnixA* via une conformation différente de l'extrémité N-ter ne semble pas évident pour expliquer la liaison d'HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2*. Pour identifier un rôle éventuel de

cette extrémité N-ter dans la liaison d'HpNikR à *pNiFu* et *pnikRS2*, sa délétion ou mutation serait nécessaire.

Un quatrième sel métallique, le sulfate de cobalt, a été testé pour essayer d'activer HpNikR.

Des retards sur gel ont été observés dans des conditions où l'excès de Mn(II) était remplacé par un excès de Co(II) (Figure IV.25). HpNikR se lie donc à ces deux motifs en présence d'un excès de Co(II). Un effet synergique avec du Ni(II) est de nouveau observé de façon qualitative.

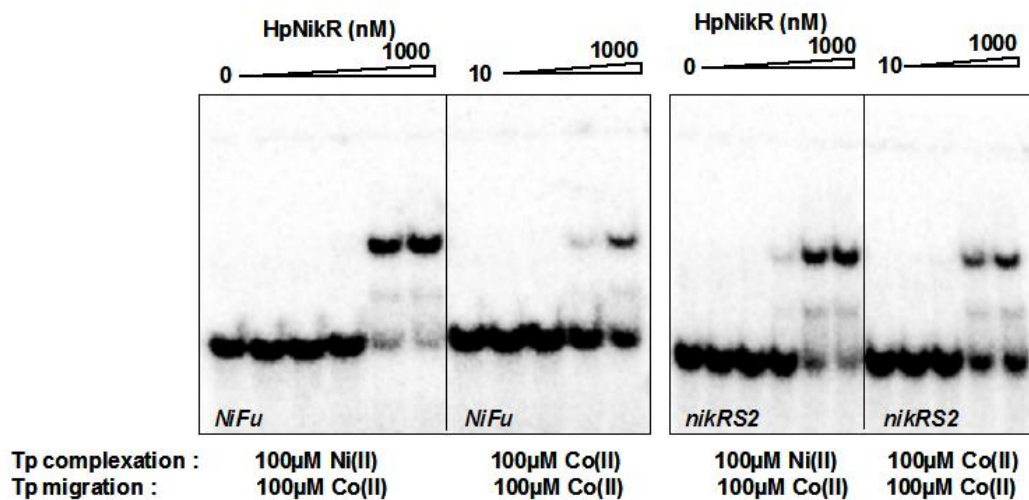


Figure IV.25 Liaison à l'ADN (A : *NiFu* – B : *nIKRS2*) en présence d'un excès de Co(II) en migration. HpNikR (0 ; 0.01 ; 0.05 ; 0.1 ; 0.5 et 1μM) incubé avec 500pM d'ADN en présence d'ADN compétiteur à 1.5μg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et 100μM de Ni(II) (A1/B1) ou de Co(II) (A2/B2). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8% ; le gel et le tampon (100mM BisTris Borate pH7.4) contiennent du CoSO₄ à 100μM.

Le Co(II) jouerait donc le même rôle que le Mn(II).

Dans nos conditions, la liaison d'HpNikR sur ces séquences individuelles (*NiFu* et *nIKRS2*) n'a pas été mesurée en présence de Ni(II) alors qu'il s'agit de son métal de régulation contrairement à la liaison observée sur *pureA* et *pnixA*. Cette particularité expérimentale montre que l'absence de liaison n'est pas due à des problèmes expérimentaux mais bien à une différence de réactivité et probablement à une faible affinité d'HpNikR-Ni pour les séquences *NiFu* et *nIKRS2* comme nous allons le confirmer en utilisant une seconde technique (IV.3 p-242 -).

IV.2.4. Discussion : Liaison sur *NiFu* et *nikRS2* versus *pnixA* et *pureA*

Les conditions métalliques, pour qu'une liaison d'HpNikR sur les motifs individuels *NiFu* et *nikRS2* soit observée, ne sont pas identiques à celles identifiées pour sa liaison sur *pnixA* et *pureA*. Cependant HpNikR est en mesure de lier ces quatre motifs en suivant la même stoechiométrie 1:1 de liaison pour 1 tétramère lie 1 ADN.

Autant HpNikR peut se lier à *pnixA* et à *pureA* en présence d'un excès de Ni(II), de Mn(II) ou de Mg(II) dans le tampon de migration avec un Kd de l'ordre du nanomolaire, autant HpNikR ne peut se lier à *NiFu* et *nikRS2* qu'en présence d'un excès de Mn(II), ou de Co(II) dans le tampon de migration avec un Kd allant de la dizaine à la centaine de nanomolaires. En présence d'un large excès de Ni(II) en migration, une très faible liaison d'HpNikR à l'ADN (10%) est observée avec 3 µM de protéine mis à part en EMSA fluorescent (Kd de l'ordre du micromolaire). Dans les conditions d'EMSA fluorescent, 200 fois plus d'ADN sont disponibles qu'en EMSA radioactif.

Le peu de liaison mesurée en conditions Ni/Ni est assez surprenant et diffère de ce que proposait le groupe de V. Scarlato (Delany *et al.*, 2005). Cela signifie clairement qu'HpNikR en conditions Ni/Ni présente une mauvaise affinité pour *NiFu* et *nikRS2*. Cette affinité se voit augmentée en présence de Mn(II) ou de Co(II) (effet synergique des métaux). Ces deux métaux joueraient donc un même rôle dans le mécanisme d'activation ou du moins dans la stabilisation du complexe à observer en EMSA en assurant la métallation d'un second site.

Le Mn(II) et le Co(II) sont également en mesure d'activer seuls HpNikR, cependant l'affinité du site HA d'HpNikR **et/ou** d'un site proche pour ces métaux est inférieure à celle pour le Ni(II). En effet l'affinité de la protéine pour *NiFu* et *nikRS2* en conditions Ni/Mn ou Ni/Co est supérieure à celle en conditions Mn/Mn ou Co/Co qui est elle-même largement supérieure à celle en conditions Mn/Ni.

En résumé, la liaison du nickel dans son site de haute affinité, *a priori*, ne serait pas suffisante pour induire la liaison à l'ADN d'HpNikR dans nos conditions (mauvaise affinité de la protéine pour les séquences testées). La présence d'un ion métallique autre que le Ni(II) tel que le Mn(II) ou le Co(II) dans un site stabilisateur de basse affinité serait nécessaire.

La présence des trois acides aminés GSH en N-ter d'HpNikR utilisée par le groupe de V. Scarlato modifierait le comportement de la protéine vis-à-vis du Ni(II) et peut-être du site stabilisateur de basse affinité.

La métallation de ce site stabilisateur pourrait :

- conférer à la protéine une conformation particulière soit au niveau du domaine de liaison à l'ADN par rapport au domaine de tétramérisation soit au niveau du positionnement de l'extension N-ter pour qu'elle lie l'ADN.
- stabiliser le complexe ADN/Protéine comme cela semble être le cas du Mg(II) dans la liaison d'HpNikR à *pnixA* d'après la littérature (Benanti & Chivers, 2007).

Le complexe Ni-HpNikR/*NiFu* ou Ni-HpNikR/*nikRS2* pourrait être aussi déstabilisé en présence d'un large excès de Ni(II) en migration, la protéine alors s'agrègerait massivement sans lier d'ADN et ne serait donc plus disponible pour se lier à l'ADN. La protéine, ayant une mauvaise affinité pour le Mn(II), ne s'agrègerait pas ou beaucoup moins et serait donc plus disponible pour se lier à l'ADN. Le Mn(II) et le Co(II) aurait alors un caractère protecteur contre l'agrégation.

Cette hypothèse serait vraisemblable si aucune liaison d'HpNikR sur *pureA* ou *pnixA* n'avait été observée en condition NiNi à moins que l'affinité de la protéine métallée pour ces séquences tire l'équilibre vers la formation du complexe Protéine/ADN plutôt que vers l'agrégation de la protéine. L'affinité d'HpNikR-Ni seule pour *NiFu* et *nikRS2* étant mauvaise, l'équilibre pourrait être plutôt en faveur de l'agrégation de la protéine que de la formation et stabilisation du complexe Protéine/ADN. Le Mn(II) et le Co(II) déplaceraient les équilibres en stabilisant le complexe. Le mécanisme de stabilisation n'est pas similaire à celui du Mg(II).

Un schéma récapitulatif du mode d'action hypothétique d'HpNikR pour se lier aux différents motifs peut être proposé. Un équilibre entre la forme métallée d'HpNikR capable d'agréger et la forme métallée d'HpNikR capable de se lier à l'ADN doit exister. Il serait fonction de l'affinité de la protéine pour la séquence à lier et des conditions métalliques (Figure IV.26).

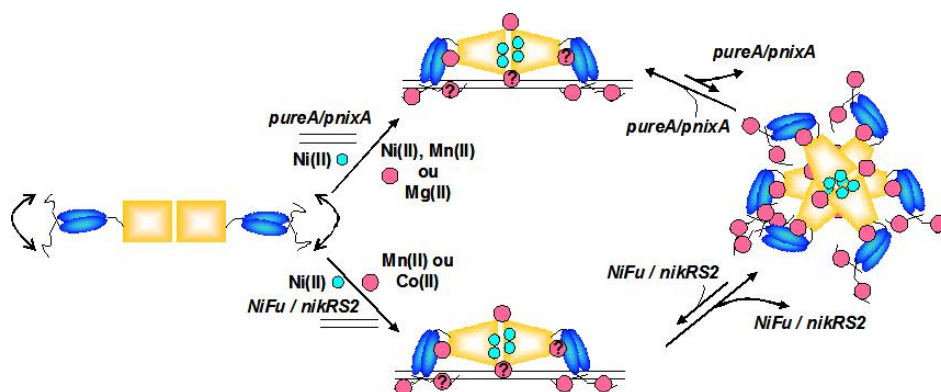


Figure IV.26 Mode d'activation d'HpNikR pour la liaison sur *pureA/pnixA* versus *NiFu/nikRS2*. HpNikR peut être activée par différents métaux. La localisation et la nature du site stabilisateur (sphères roses) sont indéfinies.

Par ailleurs, notre étude montre que le mécanisme de liaison d'HpNikR selon la séquence ne serait pas non plus tout à fait similaire. L'absence de coopérativité mesurée pour la liaison d'HpNikR sur *NiFu/nikRS2* vs *pnixA/pureA* pourrait être liée soit à la différence de séquence propre, soit à l'absence de « contrainte » de la protéine pour se lier sur une séquence de 44 ou 47 pb par rapport à une liaison sur une séquence de 32 pb (*pureA* et *pnixA*), soit à des différences d'interactions de la protéine avec l'ADN.

Récemment, des travaux réalisés par le groupe de D. Zamble, présentés au congrès ICBIC XIII à Vienne en juillet 2007, ont montré qu'HpNikR sauvage en footprint ne se liait pas sur *pnikR* à pH neutre en présence d'un excès de nickel (Li *et al.*, 2007). Cette liaison n'était possible qu'à pH acide (5,8) alors que le groupe de V. Scarlato a observé cette protection à pH 7,8 (Delany *et al.*, 2005).

Contrairement aux travaux réalisés par l'équipe de D. Zamble avec une protéine sauvage, les travaux de groupe de V. Scarlato (Delany *et al.*, 2005) ont été réalisés avec une protéine présentant 3 résidus supplémentaires sur l'extension N-ter « GSH ». La différence de comportement observé en footprint entre ces deux équipes pourrait être principalement dépendante de la modification de l'extension N-ter. La présence d'une histidine, qui est un bon ligand du Ni(II), pourrait créer ou modifier la nature d'un potentiel site stabilisateur présent dans l'extension N-ter et augmenter « artificiellement » l'affinité de la protéine métallée par du Ni(II) pour les séquences *NiFu* et *nikRS2*.

Par ailleurs le groupe de D. Zamble a montré en EMSA qu'HpNikR se liait sur son motif individuel *pnikR* en présence d'un large excès de Ni(II) (800µM) avec un Kd de 7µM (Li *et al.*, 2007). Ceci montre clairement qu'HpNikR à pH neutre peut se lier à *pnikR* en présence d'un large excès de Ni(II), mais que son affinité est très mauvaise. La liaison que nous observons en présence de Mn(II) ou de Co(II) traduit l'effet synergique de ces métaux à l'effet du Ni(II), il serait intéressant d'analyser la réalité physiologique d'une telle synergie.

La liaison d'HpNikR sur cette séquence *pnikR* et éventuellement sur d'autres séquences opératrices serait non seulement métal-dépendante mais aussi pH-dépendante. Modifier le pH revient à modifier l'état de protonation de certains résidus et donc modifier l'affinité des sites potentiels pour les métaux, mais aussi changer moyennement la charge de la protéine. L'effet du Mn(II) et du Co(II) pourrait mimer l'effet d'une acidification du tampon en neutralisant des charges négatives et en limitant l'agrégation, mais pas le Mg(II) ni le Ni(II).

L'extension N-ter ne jouerait pas le même rôle selon qu'HpNikR lie *pnixA*, *pureA* ou encore *pnikR* ou *pexbB*. Des interactions différentes de cette extension avec la protéine et/ou l'ADN pourraient être mises en jeu. La métallation d'autres sites pourrait également avoir lieu.

En conclusion, il est clair que les mécanismes mis en jeu par HpNikR pour se lier à l'ADN sont complexes mais il est clair qu'il existe une différence entre la liaison sur *pnixA* et *pureA* versus *pnikR* et *pexbB*. La réactivité de liaison d'HpNikR serait séquence, métal et pH dépendante. Il serait intéressant d'étudier la liaison de la forme Δ Nt9-HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2* dans nos conditions expérimentales afin de savoir si l'effet du Mn(II) et du Co(II) passe par cette extension ou non.

IV.3. Liaison d'HpNikR sur la région intergénique suivie avec un test nucléase

Afin d'étudier la liaison d'HpNikR à l'ADN sur la région intergénique entière, un test de protection à la nucléase a été construit. Pour cela la région intergénique a été introduite dans un plasmide. Cette technique permet, d'une part, de s'approcher des conditions dans lesquelles peut se trouver l'ADN *in vivo* (superenroulé / [C]~nM). D'autre part, si des repliements de l'ADN sont nécessaires pour que des interactions avec plusieurs sites aient lieu, nous pourrions les observer.

Le test de protection à la nucléase avait au préalable été utilisée au laboratoire pour étudier la liaison d'EcFUR sur le promoteur de l'aérobactine (Bagg & Neilands, 1987; D'Autreaux *et al.*, 2002).

Une séquence liée par une protéine est insérée dans un vecteur plasmidique. Cette séquence peut intrinsèquement présenter un site de coupure pour une enzyme de restriction, si ce n'est pas le cas un site de coupure est créé de préférence entre les demi-sites de liaison d'HpNikR. La mutation doit être la moins « lourde » possible pour éviter de perturber la liaison à l'ADN. Par la suite, la liaison de la protéine à cette séquence sera déterminée en fonction du profil de digestion du vecteur (Figure IV.27).

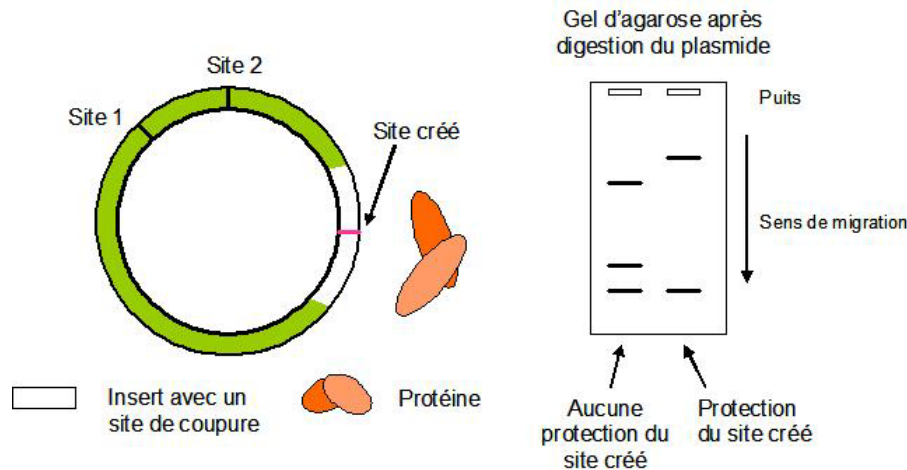


Figure IV.27 Principe du test de protection à la nucléase. Une séquence d'ADN liée par une protéine est insérée dans un vecteur plasmidique. Un site de coupe pour une enzyme est créé dans la séquence. Ce vecteur est ensuite digéré par l'enzyme après qu'il y ait eu ou non une incubation avec la protéine. Si le profil de digestion du vecteur plasmidique en présence de protéine diffère du profil de digestion initial, cela signifie que la protéine s'est liée à l'ADN.

Le plasmide comprenant la région intergénique modifiée a été construit en collaboration avec Kristine Schauer de l'Institut Pasteur.

Pour ce test, la région intergénique *nikR-exbB* a été introduite dans un plasmide pUC18 entre les sites de coupe HindIII-BamHI (Figure IV.28). Cette séquence comprend le motif de liaison prédit pour HpNikR (*nikR* Box décrit par (Contreras *et al.*, 2003)), le site reconnu par HpNikR et HpFUR (noté *NiFu*), le site de liaison propre à HpFUR (notée *furS2*) et à HpNikR (noté *nikRS2*) (Figure IV.28). Ces différents motifs peuvent être liés par HpNikR et/ou HpFUR, excepté le motif prédit.

```

5' AAGCTTGTCTTTATTGGGTGTATCCATTTGAGAAAAATCCTTTTTTGGCATGAGTTCGTTAAAAGCCGCTCATGCTAGTATG
ATTGAATTAATTAAAAATGAACAAATTATAATACAAACTGGATTAAATGGTTGGTCATAAGAGCGTTTGGATTTGATTCTAA
TTATTAGCTTAATCATTAATTGACTTGTATTATTAAACAAATATATCAACAAACCAACATTCTTTATCATTTTGGAGCAT
TTATGCGAACGAATGCTTCTTAAAGAGTGCATGCTCTTAGAGTATGTCTGTATCGCATGTTGCTTTAATCTTAAGGAAATTG
TTTTATCATAGACAAGGAGGGATCC 3'

```

Figure IV.28 Séquence intergénique introduite dans le pUC18 entre les sites de coupe de HindIII et BamHI (précisés en italique, ombré). Le motif prédit est juste souligné. La séquence *NiFu* originale est précisée dans le cadre ouvert, le site PsiI natif est souligné en bleu. La séquence *furS2* mutée est précisée dans le cadre grisé, le site HinfI créé est souligné en rouge et la base mutée est en italique. La séquence *nikRS2* mutée est précisée dans le cadre noir, le site SspI créé est souligné en vert et la base mutée est en italique.

Le site *NiFu* contient un site de restriction reconnu par l'enzyme PsiI, le motif prédit présente un site de restriction reconnu par l'enzyme BsrBI. Les sites *furS2* et *nikRS2* ne contiennent aucun site de coupe pour des enzymes de restriction commerciales. Des sites de coupe reconnus par HinfI et par SspI ont été créés respectivement dans les sites *furS2* et *nikRS2*

comme cela a été décrit en Matériel et Méthodes et présenté dans la [Figure IV.28](#). Seule une base a été mutée afin de minimiser les effets sur la liaison d'HpNikR à l'ADN (affinité).

Le plasmide construit a été nommé pHP2S, sa carte est représentée ci-dessous :

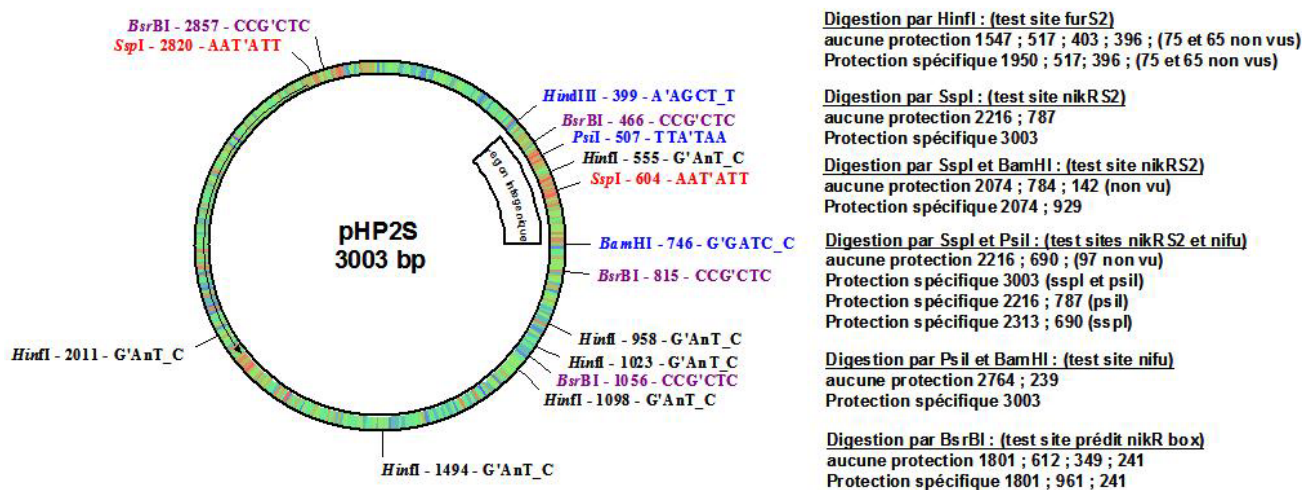


Figure IV.29 Carte du plasmide pHP2S, sur laquelle sont présentés les différents sites de coupure par les enzymes de restriction BamHI, HindIII, HinfI, SspI, PstI et BsrBI. Les tailles des fragments obtenus après digestion du plasmide en cas de non protection et protection du site d'intérêt par la protéine sont répertoriées en pb.

La liaison d'HpNikR sur les sites *NiFu*, *furS2* et *nikRS2* a été testée en absence, et en présence de différents sels métalliques.

IV.3.1. Mesure de la protection en absence de métal autre que le magnésium

Les expériences ont, tout d'abord, été réalisées en absence de métal et en absence de protéine puis en présence uniquement de protéine ([Figure IV.30](#)).

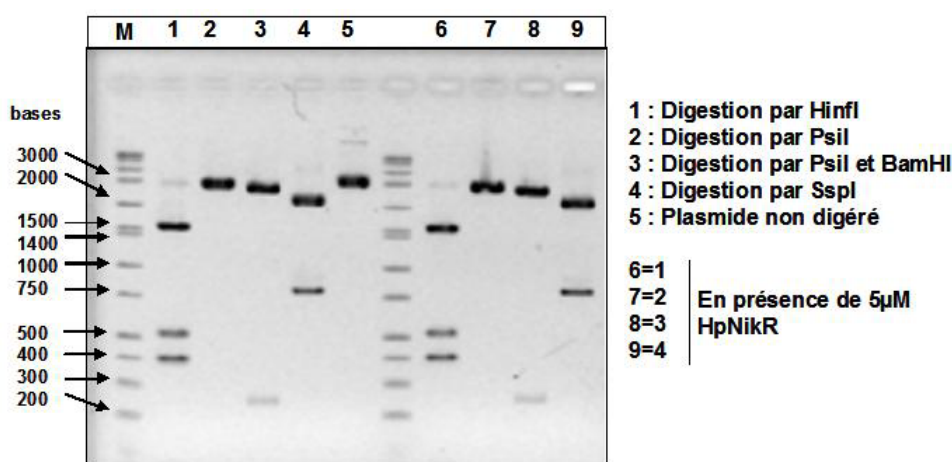


Figure IV.30 Test de protection à la nucléase en absence de métal dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl et 3mM MgCl₂). HpNikR à 5µM est mise en présence de pHP2S à 20nM pendant 20 minutes à T°C. L'ADN est ensuite digéré pendant 30 minutes à 37°C avec 3 unités d'enzymes. L'ADN digéré est déposé sur gel d'agarose à 1.5%. Aucune liaison d'HpNikR n'est notable.

Dans ces conditions, aucune protection par HpNikR n'a été observée. HpNikR ne se lie donc pas sur ces séquences en absence de métal.

IV.3.2. Mesure de la protection en présence de métal

Les expériences ont ensuite été réalisées en présence de métal ($MnCl_2$ et $NiCl_2$) (Figure IV.31)

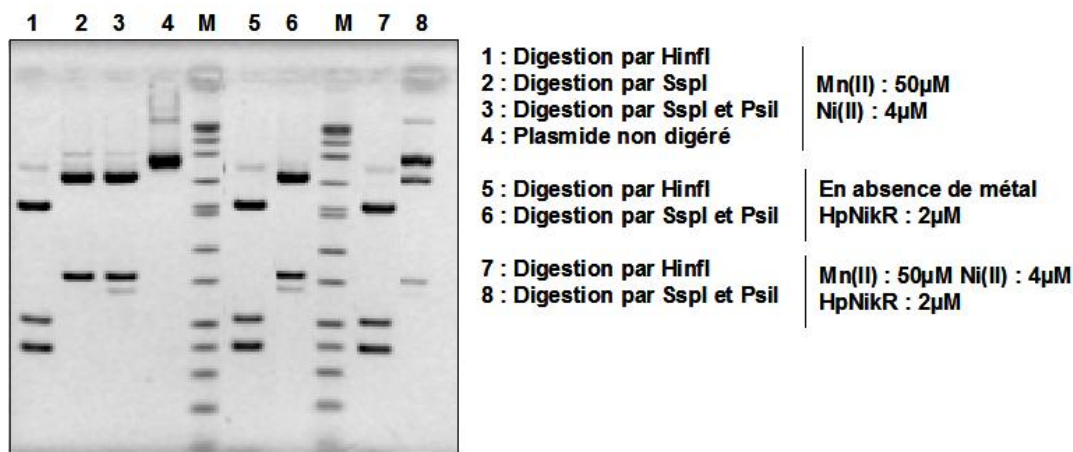


Figure IV.31 Test de protection à la nucléase en présence de $MnCl_2$ et de $NiCl_2$ dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl et 3mM $MgCl_2$). HpNikR à 2μM est mise en présence de pHP2S à 20nM pendant 20 minutes à T°C ambiante. L'ADN est ensuite digéré pendant 30 minutes à 37°C avec 3 unités d'enzymes. L'ADN digéré est déposé sur gel d'agarose à 1.5%.

En présence de $Mn(II)$ à 50μM et de $Ni(II)$ à 4μM dans le tampon de complexation, les enzymes sont toujours actives (Figure IV.31 puits 1, 2 et 3). L'enzyme de restriction PstI ici a perdu de son efficacité en raison du changement de tampon qui lui est imposé avant la digestion à l'ADN (digestion pouvant être totale dans les mêmes conditions métalliques). En effet deux bandes à 787 et 690pb sont notables, au lieu de n'observer qu'une bande à 690 pb (puits 3). En présence de $Mn(II)$ et de $Ni(II)$, HpNikR ne protège pas le site furS2 (Figure IV.31 puits 7 vs 5) qui *a priori* ne lui était pas spécifique. HpNikR, en présence de métal, ne tend pas à polymériser sur l'ADN.

Par contre, une protection partielle du site *NiFu* et/ou *nikRS2* est observable. En effet la bande à 690 pb disparaît et les bandes à 787 et 2216 pb sont moins intenses dans le puits 8 par rapport au puits 6 où la protéine est apo (Figure IV.31). La mutation dans le site *nikRS2* ne semble pas empêcher la liaison à l'ADN.

Afin de mesurer l'influence individuelle des sels métalliques, un nouvel essai de protection a été réalisé en mettant soit du $Mn(II)$ à 50μM soit du $Ni(II)$ à 4μM dans le tampon de

complexation. Les profils de digestion du plasmide observés après incubation avec ou sans HpNikR, en présence de Mn(II) ou de Ni(II) sont observés sur la [Figure IV.32](#).

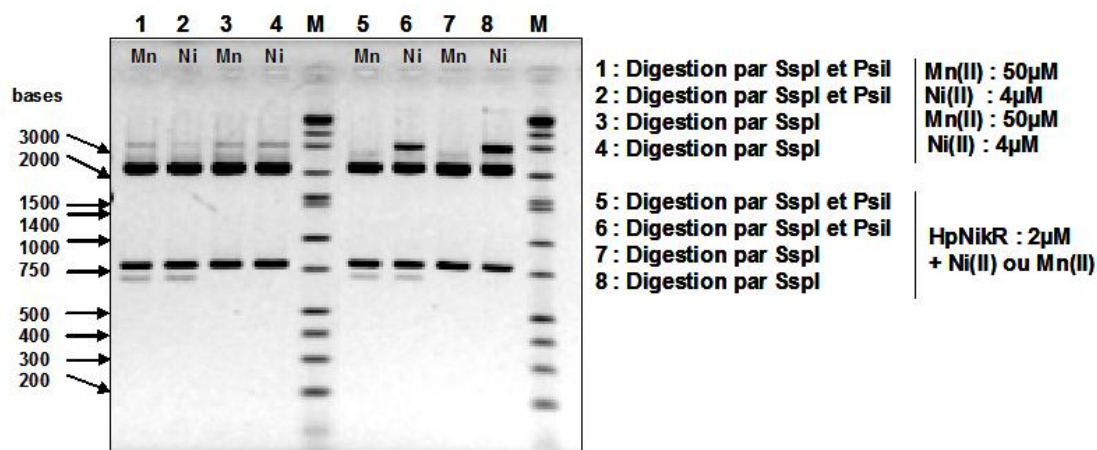


Figure IV.32 Test de protection à la nucléase en présence de MnCl₂ ou de NiCl₂ dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl et 3mM MgCl₂). HpNikR à 2µM est mise en présence de pHP2S à 20nM pendant 20 minutes à T°C ambiante. L'ADN est ensuite digéré pendant 30 minutes à 37°C avec 3 unités d'enzymes. L'ADN digéré est déposé sur gel d'agarose à 1.5%.

Le Mn(II) seul ne semble pas induire une liaison d'HpNikR à l'ADN (aucune protection puits 5 et 7). Le Ni(II), quant à lui, induit une liaison d'HpNikR à l'ADN qui se traduit par une protection partielle du site *nikRS2* (apparition de la bande à 3003 dans le puits 8 vs puits 4). Un effet synergique du Mn(II) couplé au Ni(II) semble exister si l'on compare le profil de digestion du puits 6 de la [Figure IV.32](#) avec celui du puits 8 de la [Figure IV.31](#). La proportion de la bande à 3003 pb est plus importante en présence de Mn(II)/Ni(II) qu'en présence de Ni(II) et la bande à 690 pb a disparu.

Le Mn(II) faciliterait la protection du site *NiFu* ainsi que du site *nikRS2* par HpNikR métallée au Ni(II). La protéine semble donc aussi lier du Mn(II) puisque celui-ci a un effet. La proportion de protéine métallée (site de haute affinité et autre site) uniquement au Mn(II) dans ces conditions ne doit pas être suffisante pour assurer une liaison sur le *NiFu* et le site *nikRS2*. L'association NiMn doit en augmenter la proportion avec une protéine 100% métallée dans le site de haute affinité par le Ni(II), le Mn(II) pourrait alors lier d'autres sites. A première vue, des résultats différents de ceux observés en EMSA sont obtenus excepté pour cet effet synergique NiMn.

La liaison d'HpNikR sur *nikRS2* seule a été mesurée en faisant une double digestion SspI/BamHI en présence de 1, 2 et 4 équivalents de Ni(II) ainsi que de 20 équivalents de Mn(II) ([Figure IV.33](#)). De cette façon, la liaison d'HpNikR sur le motif *nikRS2* peut être plus finement analysée. Les métaux à 20 µM (4 eq Ni(II)) et 100µM (20 eq Mn(II)) ne perturbent

pas la digestion de l'ADN par SspI et BamHI (puits 1 à 5). En absence de métal, HpNikR ne se lie pas à l'ADN (puits 6), par contre en présence de métal la protection du site *nikRS2* est observée (puits 7 à 12) mais pas exclusivement.

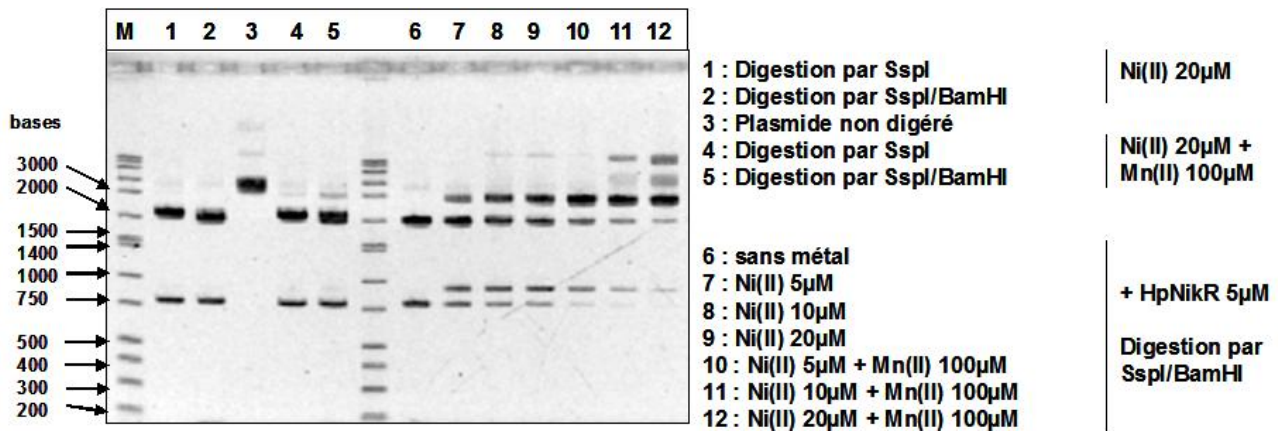


Figure IV.33 Test de protection à la nucléase en présence de NiCl₂ (et de MnCl₂) dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl et 3mM MgCl₂). HpNikR à 5µM est mise en présence de pHP2S à 20nM pendant 20 minutes à T°C ambiante. L'ADN est ensuite digéré pendant 30 minutes à 37°C avec 3 unités d'enzymes. L'ADN digéré est déposé sur gel d'agarose à 1.5%.

En théorie, en absence de protection, 3 bandes sont observables (2074, 784 et 142) lorsque pHP2S est digéré par SspI et BamHI, ceci a été confirmé. En présence de métal, si HpNikR se lie spécifiquement à *nikRS2*, 2 bandes doivent être observées à 2074 et 929pb. Ces 2 bandes sont observées donc HpNikR se lie bien à ce site, cependant la bande à 3003 pb est également notable. Cette bande correspondrait à de l'ADN linéaire coupé par une enzyme si l'on compare son niveau de migration à celui de l'ADN non digéré. Cela signifierait que SspI n'aurait pas coupé l'ADN et que seule BamHI aurait agi, ou alors qu'HpNikR protégerait son site ainsi que le site de BamHI, HpNikR se lierait de façon aspécifique à l'ADN ? Le site de BamHI ou de SspI propre au plasmide serait-il à proximité d'un motif lié par HpNikR ?

L'analyse de la séquence a révélé qu'un demi motif de la séquence consensus d'HpNikR recouvre le site de coupure natif de SspI (Figure IV.34).

5' -aaatgttgaatactcactctctcttttc**AAT**ATTattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggata- 3'

Figure IV.34 Extrait de la séquence plasmidique du pUC18, en gras : site de coupure de SspI, souligné : demi motif consensus reconnu par HpNikR (motif consensus TATwATT n11 AATwATA (Ernst *et al.*, 2006))

Ces gels montrent que non seulement HpNikR peut se lier sur *nikRS2* mais ils suggèrent aussi qu'HpNikR est capable de lier un demi-motif. Cette liaison serait spécifique.

Afin de vérifier ce point, il faudrait analyser la capacité d'HpNikR métallée à lier le site de coupure natif de SspI dans un plasmide vide.

Le fait d'observer des liaisons partielles viendrait du fait que cette construction plasmidique présente 2 sites entiers de liaisons d'HpNikR (*NiFu* et *nikRS2*) ainsi qu'un demi motif. Il faudrait plus de 5 μ M de protéine pour lier l'ensemble de ces sites.

La présence de Ni(II) suffit pour observer une protection des sites de liaisons (notée clairement pour le site *nikRS2* et le demi-site). Le Mn(II), quant à lui, aurait un effet synergique avec le Ni(II) sur la protection de l'ensemble des sites mis à part *furS2*. Aucun effet du Mn(II) seul n'est notable dans les conditions testées [Figure IV.32](#).

IV.3.3. Mesure de la liaison d'HpNikR sur les motifs prédits

Afin de mesurer la liaison d'HpNikR sur le motif prédit par Contreras *et al.*, et de confirmer les données observées par Delany *et al.*, des gels retard et des tests nucléases ont été réalisés.

En EMSA, en présence d'un large excès de Ni(II) et/ou de Mn(II) (tampon d'incubation et de migration), aucun retard sur gel n'a été mesuré pour une gamme de concentration de protéine allant de 0 à 3 μ M (non montré).

En test nucléase, la liaison ou non a été mesurée au travers de la protection du site de coupure de l'enzyme BsrBI. En cas de non protection du site, 4 bandes sur le profil de digestion seront mesurables à 1801, 612, 349 et 241 pb. En cas de protection du site spécifique, 3 bandes sur le profil de digestion seront notables à 1801, 961 et 241 pb. La digestion de l'ADN par BsrBI tend à être réduite en présence de métal (Ni(II) à 20 μ M et/ou Mn(II) à 100 μ M) (puits 2 à 4 [Figure IV.35](#)). En présence de protéine, aucune protection du motif prédit n'a été observée en absence comme en présence de métal (Ni(II) et/ou Mn(II)) ([Figure IV.35](#)).

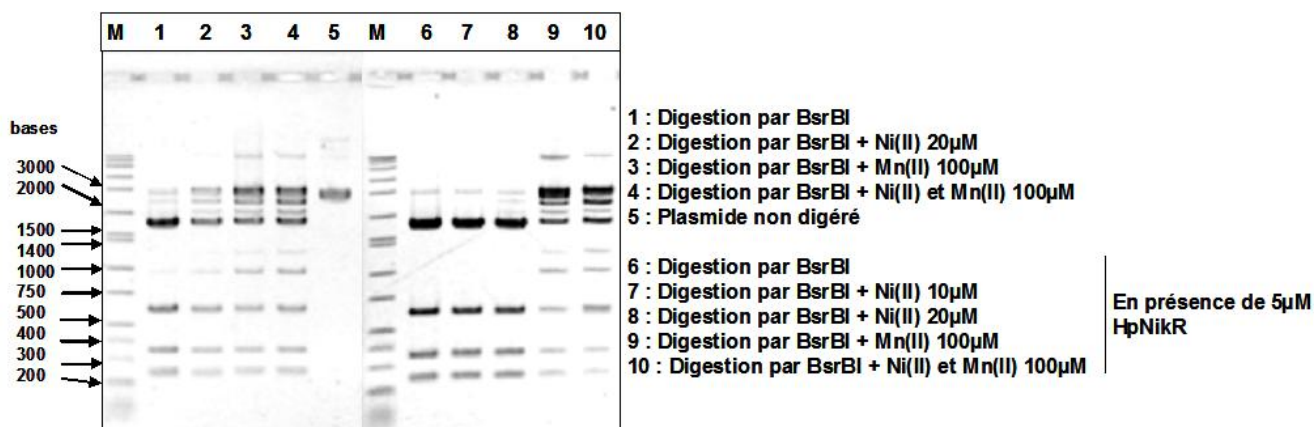


Figure IV.35 Test de protection à la nucléase en présence de NiCl₂ (et de MnCl₂) dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl et 3mM MgCl₂). HpNikR à 5 μ M est mise en présence de pHP2S à 20nM pendant 20 minutes à T°C ambiante. L'ADN est ensuite digéré pendant 30 minutes à 37°C avec 3 unités d'enzymes. L'ADN digéré est déposé sur gel d'agarose à 1.5%. BsrBI tend à être inhibée en présence de Ni(II) à 20 μ M et/ou de Mn(II) à 100 μ M.

Si une liaison sur ce motif avait lieu de façon individuelle, l'affinité pour ce site serait plus faible que pour les sites *NiFu* et *nikRS2* pour lesquels une liaison partielle est observée dans des conditions similaires. Si cette séquence avait un caractère synergique pour permettre la liaison d'HpNikR sur la région intergénique en présence de Ni(II), *a priori*, une protection aurait été notée.

IV.3.4. Discussion : Liaison sur *NiFu* et *nikRS2* selon la technique employée

HpNikR est connue comme étant capable de réprimer de façon Ni-dépendante la transcription de son gène (Contreras *et al.*, 2003) ainsi que de l'opéron *exbB-exbD-tonB* (Contreras *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2006). Les séquences liées par HpNikR pour assurer ces régulations font l'objet de nombreuses discussions.

Nous avons donc choisi de mesurer la liaison d'HpNikR sauvage sur ces motifs *NiFu*, *nikRS2* et le motif prédit de façon individuelle par EMSA et de façon intégrative par le test de protection à la nucléase. Des résultats différents ont été observés en fonction de la technique employée.

En EMSA, la liaison d'HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2* n'a pas été observée en présence d'un excès de Ni(II) en raison de sa mauvaise affinité pour ces deux séquences.

La liaison sur *NiFu* et *nikRS2* n'a été observée qu'en présence d'un excès de Mn(II) ou de Co(II) dans le tampon de migration. La présence de ces deux métaux assure une liaison minimale de la protéine à l'ADN. Cette liaison à *NiFu* et à *nikRS2* serait renforcée en présence de Ni(II) pendant l'incubation (meilleure affinité). L'association de ces métaux (Ni/Mn ou Ni/Co) aurait un caractère synergique.

Nous avons proposé que le Mn(II) ou le Co(II) stabiliserait le complexe HpNikR-Ni-ADN :

- en liant un site de plus basse affinité pour limiter une répulsion entre l'ADN et la protéine
- et en limitant l'agrégation de la protéine.

Ces deux métaux permettraient d'augmenter l'affinité de la protéine métallée au Ni(II) pour ces séquences *NiFu* et *nikRS2*.

Dans le test à la nucléase, contrairement à ce qui a été observé en EMSA, la liaison d'HpNikR à l'ADN est mesurable avec du Ni(II). Par contre en présence uniquement de Mn(II), HpNikR ne se lie pas sur ses motifs *NiFu* et *nikRS2*.

Mais son effet synergique avec du Ni(II) est conservé pour la liaison sur *NiFu* et sur *nikRS2*. Le Mn(II) ne serait pas donc indispensable mais tendrait à améliorer l'affinité d'HpNikR métallée au Ni(II) sur ces séquences.

La métallation du site de haute affinité d'HpNikR par du Ni(II) suffirait pour observer une protection sur *nikRS2*. L'effet du Ni(II) seul sur la protection du site PsiI présent dans la séquence *NiFu* est moins évident en raison de la fragilité de l'enzyme qui ne digère que partiellement l'ADN même sans protéine. Un nouveau site de restriction pour une enzyme moins fragile devrait être créé dans ce site *NiFu* pour faciliter l'interprétation de la liaison d'HpNikR.

HpNikR métallée au Ni(II) et/ou au Mn(II) ne protège pas le site de coupure de HinfI créé. HpNikR ne se lie pas à *furS2*. HpNikR métallée ne polymérise pas sur l'ADN. Les protections et donc les liaisons mesurées sont bien spécifiques.

Des différences « expérimentales » existent entre nos deux tests et peuvent justifier les différents résultats observés. Ces différences sont les suivantes :

- La quantité de métal

En effet pour le test nucléase, autant ou 2 fois moins de Mn(II) et jusqu'à 25 fois moins de Ni(II) sont utilisées en comparaison à l'EMSA afin de limiter l'inhibition des nucléases (Rapport Métal/Protéine inférieur). De plus, le caractère agrégatif d'HpNikR est moins sollicité.

En présence uniquement de Ni(II) dans le test de protection, HpNikR est 100% métallée dans son site de haute affinité (il en est de même en EMSA). La protéine serait 100% active. Par contre en EMSA, la protéine est 100% métallée (site HA et autres sites) mais pas 100% active ; en effet elle pourrait être partiellement agrégée en raison de l'excédant de métal présente pendant la migration.

En présence uniquement de Mn(II) dans le test de protection, le site de haute affinité natif et/ou d'autres sites pourraient ne pas être de 100% métallés si le $K_{d_{Mn}}$ est très faible (~ dizaine de μM). La proportion de protéine activée en présence seule de Mn(II) ne serait peut-être pas suffisante pour protéger les différents sites.

En présence de Ni(II) et de Mn(II) dans le test nucléase, la protéine serait 100% métallée par le Ni(II) dans son site de haute affinité et le Mn(II) serait plus disponible pour être lié dans un second site (d'où la caractère synergique observable en EMSA et en test nucléase).

- La spéciation du métal

En EMSA, la composition du tampon de migration peut influencer la stabilité du complexe. Ce tampon ne contient pas de sel de type KCl, NaCl... qui permettrait au métal ($NiCl_2$, $MnCl_2$) d'échanger moins rapidement son contre-ion contre des molécules d'eau.

Des complexes Ni_{aqua} ou Mn_{aqua} pourraient se former avec des cinétiques différentes dans ces conditions et pourraient ne pas avoir la même fonction que le NiCl_2 ou le MnCl_2 .

- La concentration en protéine

2 et $5\mu\text{M}$ de protéines sont utilisées en test de protection (concentration par sous unité monomérique) alors que 5nM à $3\mu\text{M}$ le sont en EMSA.

Dans nos conditions d'EMSA, la liaison maximale d'HpNikR à l'ADN est observable, puisqu'il n'y a qu'une séquence oligonucléotidique à lier (500pM). Dans le test de protection à l'ADN, seule des protections partielles ont pour l'instant été observées. En effet le plasmide contient 3 régions que lie HpNikR. Pour $5\mu\text{M}$ d'HpNikR, approximativement 50% de ces 3 sites de liaison sont protégés en présence de Ni(II) .

- Effets de dilution et de champs électrique

Le complexe ADN/Protéine en test de protection n'est soumis ni à une dilution ni au champ électrique tous deux susceptibles de le déstabiliser contrairement aux expériences d'EMSA. En effet, dans le test nucléase la migration a lieu une fois l'expérience terminée (ADN digéré par l'enzyme).

- La nature de l'ADN utilisée

Dans le test de protection à la nucléase, la liaison est mesurée sur la séquence intergénique entière introduite dans un plasmide. Cette condition expérimentale est plus proche de la réalité physiologique (enroulement de l'ADN/Viscosité). Il y a par ailleurs 3 séquences qui peuvent être potentiellement liées par HpNikR (*NiFu*, *nikRS2*, et le demi-site). Un effet synergique entre les différents motifs (repliement de l'ADN pour des interactions protéines-protéines) pourrait expliquer des liaisons à l'ADN.

En considérant les différents résultats obtenus avec les deux techniques d'analyses, un mécanisme d'activation d'HpNikR pour lier ces séquences peut être proposé.

HpNikR doit lier *NiFu* et *nikRS2* (synergie de séquence ?) en présence de Ni(II) dans son site de haute affinité, la constante de dissociation de ce complexe serait de quelques micromolaires. L'affinité d'HpNikR pour *nikRS2* serait supérieure à celle pour *NiFu*. La liaison sur ces séquences serait potentialisée en présence d'un second métal (Mn(II) ou Co(II)) qui améliorerait l'affinité de la protéine pour l'ADN. Ce dernier lierait un second site métallique qui pourrait également accroître la stabilité du complexe. Ce site pourrait éventuellement se situer au niveau de l'extension N-ter mais n'aurait pas les mêmes répercussions au niveau structural que le Mg(II) . Ce site pourrait également se situer entre les domaines de liaison à l'ADN et de tétramérisation. L'étude faite par Benanti *et al.*, a montré

l'absence d'influence de la mutation des résidus Glu39 et Asp43 sur la liaison d'HpNikR à *pnixA*, mais n'a pas prouvé l'absence d'influence sur la liaison d'HpNikR sur *pnikR* ni sur *pexbB* (Benanti & Chivers, 2007). Pour compléter le mécanisme de liaison d'HpNikR sur cette région intergénique, il serait important de localiser et de déterminer avec exactitude la nature du second site stabilisateur, de connaître l'effet de l'extension N-ter sur la liaison d'HpNikR sur cette région intergénique. Grâce au développement du test nucléase, qui reste encore à améliorer (changement du site de coupure dans le motif *NiFu*), nous sommes maintenant en mesure d'étudier l'effet d'HpFUR sur la liaison d'HpNikR sur cette région en fonction des ions métalliques et du pH dans une moindre mesure.

IV.4. Références

- Abraham, L. O., Li, Y. & Zamble, D. B. (2006). The metal- and DNA-binding activities of *Helicobacter pylori* NikR. *J Inorg Biochem* 100, 1005-1014.
- Bagg, A. & Neilands, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471-5477.
- Benanti, E. L. & Chivers, P. T. (2007). The N-terminal arm of the *Helicobacter pylori* Ni²⁺-dependent transcription factor NikR is required for specific DNA-binding. *J Biol Chem* 282, 20365-20375.
- Chivers, P. T. & Tahirov, T. H. (2005). Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol* 348, 597-607.
- Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Labigne, A. (2003). Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 49, 947-963.
- D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16619-16624.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2005). In vitro analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187, 7703-7715.
- Dian, C., Schauer, K., Kapp, U., McSweeney, S. M., Labigne, A. & Terradot, L. (2006). Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol* 361, 715-730.
- Dian, C. (2007). Adaptive Responses by Transcriptional Regulators to small molecules in Prokaryotes: Structural studies of two bacterial one-component signal transduction systems DntR and HpNikR. *Thèse*.
- Dosanjh, N. S., Hammerbacher, N. A. & Michel, S. L. (2007). Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA) DNA interaction: metal ion requirements and sequence specificity. *Biochemistry* 46, 2520-2529.
- Ernst, F. D., Kuipers, E. J., Heijens, A., Sarwari, R., Stoof, J., Penn, C. W., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2005). The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 73, 7252-7258.
- Ernst, F. D., Stoof, J., Horrevoets, W. M., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2006). NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun* 74, 6821-6828.
- Li, Y., Abraham, L. O. & Zamble, D. B. (2007). DNA-binding property of *Helicobacter pylori* NikR. *Communication personnelle à ICBIC XIII*.
- Schreiter, E. R., Wang, S. C., Zamble, D. B. & Drennan, C. L. (2006). NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13676-13681.
- van Vliet, A. H., Poppelaars, S. W., Davies, B. J., Stoof, J., Bereswill, S., Kist, M., Penn, C. W., Kuipers, E. J. & Kusters, J. G. (2002). NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 70, 2846-2852.
- Wolfram, L., Haas, E. & Bauerfeind, P. (2006). Nickel represses the synthesis of the nickel permease NixA of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188, 1245-1250.
- Zambelli, B., Bellucci, M., Danielli, A., Scarlato, V. & Ciurli, S. (2007). The Ni(2+) binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)*, 3649-3651.

Chapitre V
Caractérisation de FUR
d'Helicobacter pylori

V.1. L'objectif de l'étude d'HpFUR

L'objectif premier de l'étude d'HpFUR était de pouvoir étudier le mécanisme de régulation croisée qui existe entre HpNikR et HpFUR pour la régulation des gènes *nikR* et de l'opéron *exbB/exbD/tonB*. Pour ce faire, cette étude implique dans un premier temps de caractériser la liaison individuelle d'HpNikR et d'HpFUR sur cette région pour ensuite mesurer des éventuelles compétitions. La caractérisation de la liaison d'HpNikR sur la région intergénique a été présentée dans le chapitre IV. L'étude de la liaison d'HpFUR sur cette région a nécessité tout d'abord l'obtention puis la caractérisation de la protéine. Ces différents résultats seront exposés après un bref rappel bibliographique sur HpFUR.

V.2. Données bibliographiques sur HpFUR

Le gène de FUR d'*Helicobacter pylori* a été identifié et caractérisé en 1998 (Bereswill *et al.*, 1998). La séquence déduite de la protéine FUR présente un degré d'homologie important avec les protéines FUR des autres espèces bactériennes (59-49% de similarité et 37-23% d'identité).

FUR_H_PYLORI	-MKRLETLESLERLRMSIKKNGLNKSKQREEVVSVLYRSG-THLSPEETHSTIQ--KD	56
FUR_C_JEJUNI	MLIENVEYDVLLERFKKILRQGGKLYTKQREVLLKTLYHSD-THYTPESLYMEIKQAEFD	59
FUR_N_MENINGITIDIS_A	-----MKKFN--IAQLKDSGLKVTGPELKILDLFETHAEHLSAEDVYRILLE--EG	49
FUR_B_PERTUSSIS	-----MSD--QSEIKNMGKATFPPLKILDLFRKSDLRLHLSAEDVYRALIA--EN	46
FUR_E_COLI	-----MTD--NNTAKKAGLKVTLPPLKILEVLQEPDNHVSASDLYKRLID--MG	47
FUR_Y_PESTIS	-----MTD--NNKALKNAGLKVTLPPLKILEVLQNPACHVSAEDLYKILID--IG	47
FUR_V_VULNIFICUS	-----MSD--NNQALKDAGLKVTLPPLKILEVLQOPDCCHISAEEDLYKKLID--LG	47
FUR_H_INFLUENZAE	-----MSEGNIKLKKVGLKITEPPLTILALMQNHKNEHFSASDLYKIFLE--QG	48
FUR_P_AERUGINOSA	-----MVE--NSELRKAGLKVTLPPLKILQMLDSAEQRHMSAEDLYKALME--AG	46
FUR_B_SUBTILIS	-----MENRIDRIKKQLHSSSYKLTPOREATVRVLENEEDHLSAEDLYLVKE--KS	51
FUR_S_EPIDERMIDIS	-----MNTNDAIKILKDNGLKYTDKPKDMLDIFVEED-KYLNARHIOQKMDK--DY	48

FUR_H_PYLORI	KNTSISSVIRILNLFLEKENFCVLETSKSGRRYEIAAK---EHHDHICLHCGKIIEFAD	113
FUR_C_JEJUNI	LNVGIAIVYRTLNLLLEAAEMVTSISFGSAGKKYELANK---PHHDHMCCKNCGKIIEFEN	116
FUR_N_MENINGITIDIS_A	VEIGVATHYRVLTQFEQAGILQHHFETGKAVYELDKG---DHHDHVCVKCGVTEFHN	106
FUR_B_PERTUSSIS	VEIGLATVYRVLTQFEQAGILTRSQFDTGKAVFELNDG---DHHDHLCCTNCGTVFERSD	103
FUR_E_COLI	EEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEKGKSVFELTQQ---HHHDHLCCLDCGKVIETSD	104
FUR_Y_PESTIS	EEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEKGKSVFELTQQ---HHHDHLCCLDCGKVIETSN	104
FUR_V_VULNIFICUS	EEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEKGKSVFELSTQ---HHHDHLVCLDCGKVIETSD	104
FUR_H_INFLUENZAE	CEIGLATVYRVLNQFDEAHIVIRHNFEKNKSVFELAPT---EHHDHICEDCGKVFETD	105
FUR_P_AERUGINOSA	EDVGLATVYRVLTQFEAGLVVHNFDGGHAFVFLADS---GHHDHVVCVDTGVIETMD	103
FUR_B_SUBTILIS	FEIGLATVYRTLELTELKVVDKINFGDVSRYDLRKEGAHFFHHHLVCMFAGVDEIEG	111
FUR_S_EPIDERMIDIS	PGISFDTVYRNHLFLKDLGIETESTELG-EMKFRIACTN---HHHHHFCENCGDGTKVIDF	105

FUR_H_PYLORI	PEIENRQNEVVKYQAKLISHDKMFVWCKECQES--C-----	150
FUR_C_JEJUNI	PIIERQQAIAKEHGFKLTGHLMLQLYGVCGDCNNQKAKVKI----	157
FUR_N_MENINGITIDIS_A	PEIEALQDKIAEENGYRIVDHALYMGVCSDCQAKGKR-----	144
FUR_B_PERTUSSIS	PDIEKROYKVAKDNGFVLESAMVLYGICGNCC-KGR-----	139
FUR_E_COLI	DSIEARQREIAAKHGIRLTNHSLLYLGHCAGDCREDEHAHEGK-	148
FUR_Y_PESTIS	ESIESLQREIAKQHGIKLTNHSLLYLGHCETGNCREDESAHKKR-	148
FUR_V_VULNIFICUS	DIIEERQKEIAAAYNVOLTNHSLLYLGKCGDGSCKGNPDHKKRN	149
FUR_H_INFLUENZAE	NIIEORQREISEKYGIKLTNHNVLVYKGCSDINHCDENNSK----	146
FUR_P_AERUGINOSA	AEIEKQKEIVRERGFELVDHNLVLVVRKKK-----	134
FUR_B_SUBTILIS	DLLEDVEEIIERDWKFKIKDRLTFHGICHRONGKETE-----	149
FUR_S_EPIDERMIDIS	CPTEQIKQYLPN---VTIHTKLELVYGVCECOKNA-----	138

Figure V.1 Alignement de séquences des protéines FUR de différents micro-organismes. Les acides aminés : en bleus sont parfaitement conservés, en gris sont présents au moins dans une autre espèce bactérienne que *H. pylori*, en jaune sont plutôt conservés dans les espèces autres que *H. pylori*.

HpFUR présente respectivement 34%, 28% d'identité, et 56%, 59% de similarité avec FUR d'*E.coli* et de *P.aeruginosa*.

Ces similitudes permettent à HpFUR de compléter « partiellement » une souche Δ FUR d'*E.coli* (Bereswill *et al.*, 1998; Bereswill *et al.*, 1999). HpFUR peut être également détectée avec des anticorps dirigés contre EcFUR (Bereswill *et al.*, 1999).

Il semble qu'HpFUR partage des homologies fonctionnelles et structurales avec EcFUR.

Depuis son identification, aucune caractérisation « biochimique » complète d'HpFUR n'a été décrite à ce jour dans la littérature.

Les travaux publiés sur HpFUR se sont principalement centrés sur son mode d'action : mécanisme de régulation de la transcription des gènes. La plupart du temps, ces études sont réalisées avec une protéine « taggée » en N-ter ou en C-ter.

De nombreux travaux faits sur EcFUR et PaFUR sont considérés et admis pour HpFUR bien qu'aucune mise en évidence n'ait été faite (nombre de sites, présence de métal ou non dans la protéine purifiée, fonction du métal au niveau structural, état oligomérique initial). C'est donc ce que nous avons initié.

V.2.1. La séquence protéique d'HpFUR

Le gène *fur* de *H.pylori* code pour une protéine de 17681 Da contenant 150 acides aminés. Cette protéine est relativement basique (pI_{théorique} : 8,5) en comparaison à EcFUR (pI_{théorique} : 5,6). Cette différence nous a d'ailleurs conduit à mettre en place un protocole de purification original qui sera présenté par la suite.

HpFUR présente de nombreux résidus amino-acides pouvant être de potentiels ligands des métaux tels que les cystéines ou encore les histidines (Tableau V-1).

Acide aminé (code)	Quantité	Acide aminé (code)	Quantité
Alanine (Ala _ A)	4	Leucine (Leu _ L)	12
Arginine (Arg _ R)	10	Lysine (Lys _ K)	16
Asparagine (Asn _ N)	7	Méthionine (Met _ M)	4
Aspartate (Asp _ D)	4	Phénylalanine (Phe _ F)	4
Cystéine (Cys _ C)	6	Proline (Pro _ P)	2
Glutamine (Gln _ Q)	5	Sérine (Ser _ S)	14
Glutamate (Glu _ E)	19	Thréonine (Thr _ T)	5
Glycine (Gly _ G)	4	Tryptophane (Trp _ W)	1
Histidine (His _ H)	7	Tyrosine (Tyr _ Y)	4
Isoleucine (Ile _ I)	14	Valine (Val _ V)	8

Tableau V-1 La composition en acide-aminés d'HpFUR

Il est intéressant de noter que les différents résidus identifiés comme ligands du site de régulation ou du site structural chez EcFUR ou chez PaFUR sont conservés chez HpFUR (Figure V.2).

JPred	HHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH
FUR_H_PYLORI	MKRLETLESILERLRMSIKKNGLKNSKQREEVVSVLVYRSG-T	HLSP	EITHSIRQDKNT 59
RMN	????	HHHHHHH	HHHHHHHHHH
FUR_E_COLI	-----MTDNNLTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNH	VS	AEADLYKRLIDMGEEI 50
RAY-X	HHH HHHH	HHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH H
FUR_P_AERUGINOSA	-----MVEN-SELRKAGLKVTLPVVKILQMLDSAEQR	MS	AEADVYKALMEAGEDV 49

JPred	HHHHHHHHHHHH	BBBBB	BBBBB	BBBBBB	BBBB	HHHH
FUR_H_PYLORI	SISSVYRILNFLEKENFICVLETSSKSGRRYEIAAKEH	HD	HI	ICL	HCGKIIEFADPEIENR 119	
RMN	HHHHHHHHHHHH	B?BBBB	? BBBB	?? BBBB	BBBBBB ??HHHH	
FUR_E_COLI	GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHD	HL	IC	LD	CGKVIEFSDDSIEAR 110	
RAY-X	HHHHHHHHHH	BBBBB	BBBBBB	BBBBB	BBBB HHHHHHH	
FUR_P_AERUGINOSA	GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDDGGHAF	EL	ADSG	HD	HMVCDVTGEVIEFMDAEIEKR 109	

JPred	HHHHHH	BBBBBBBBBBBB
FUR_H_PYLORI	QNEVVKKYQAKLISHDMKMFV	WCK--ECQESEC----- 150
RMN	HHHHH ?	BBBBBBBBBBBBBB
FUR_E_COLI	QREIAAKHGIRLTNHSLYLYGHGCAEGDCREDEHAHEGK 148	
RAY-X	HHHHHHH	BBBBBBBBBB BB
FUR_P_AERUGINOSA	QKEIVRERGFELVD	HNVLVY-----VRKKK----- 134

Figure V.2 Séquence protéique et structure secondaire de FUR d'*H.pylori* comparées à celles d'EcFUR et de PaFUR. Les structures secondaires d'HpFUR, d'EcFUR, et de PaFUR ont été déterminées en utilisant respectivement JPRED, les données RMN (Pecqueur *et al.*, 2006) et la résolution de la structure cristallographique (Pohl *et al.*, 2003) (B : Brin β / H : Hélice α). Les ? précisent des résidus non attribués en RMN pour EcFUR. Les cystéines sont soulignées sur toutes les séquences, les histidines d'HpFUR sont en gras et son tryptophane en position 141 est en rose. Les résidus en bleu précisent les potentiels ligands du site de régulation (définis par la structure RX/ des modèles et de la mutagenèse dirigée), les résidus en rouge précisent les ligands identifiés du site structural. L'hélice de reconnaissance de l'ADN (H α 4) théorique est précisée en vert.

La prédiction de structure secondaire d'HpFUR montre que cette dernière présenterait 5 hélices α et 5 brins β . Cette prédiction est proche des structures secondaires déterminées par RMN et par diffraction des rayons-X pour EcFUR et PaFUR respectivement mis à part pour l'hélice α 1 qui serait plus longue (Figure V.2). En effet, HpFUR comprend dans son extrémité N-ter 10 résidus supplémentaires. Etonnamment, une telle extension a également été observée pour HpNikR. Cette extension jouerait un rôle important dans la spécificité de reconnaissance de l'ADN (cf. Chapitre IV). Cette extension chez HpFUR influencerait-elle également ses propriétés de liaison à l'ADN?

La prédiction de structure suggère également la présence d'un motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé. Ce motif est caractéristique du motif de liaison à l'ADN de certaines familles de métallorégulateurs parmi lesquelles FUR. L'hélice α 4 « potentielle » d'HpFUR pourrait correspondre comme pour EcFUR et PaFUR à l'hélice de reconnaissance de l'ADN (en vert sur la Figure V.2). Cette dernière est plutôt conservée dans les FUR de

différentes espèces (motif : GLATVYR), ce n'est pourtant pas le cas chez HpFUR (motif : SISSVYR) mis à part pour « VYR ». La tyrosine de ce motif a d'ailleurs été identifiée, par des expériences de cross-link entre EcFUR et l'ADN analysées par spectrométrie de masse, comme impliquée dans la liaison à l'ADN chez EcFUR (Tiss *et al.*, 2005). Il en serait probablement de même pour HpFUR.

V.2.2. Caractéristiques d'HpFUR

HpFUR est capable de former des oligomères *in vivo* comme cela a été montré en fusionnant entièrement ou partiellement le gène *fur* au gène codant pour le répresseur Ci du phage λ (Delany *et al.*, 2002).

Cette propriété d'oligomérisation est dépendante du domaine C-ter de la protéine (résidus 75 à 150). *In vitro*, cette caractéristique a été confirmée par des expériences de cross-link pour des concentrations supérieures à 10 μ M en protéine (Delany *et al.*, 2002). HpFUR peut former au minimum des dimères. Cet état oligomérique a été considéré comme étant l'état natif de la protéine au regard des données existantes sur EcFUR et d'expériences qui laissaient envisager la formation d'hétérodimère entre EcFUR et HpFUR (Bereswill *et al.*, 1999; Fassbinder *et al.*, 2000). L'étude de deux mutants d'HpFUR D98G et H99I a montré que ces mutations n'affectaient pas les propriétés d'oligomérisation de la protéine, mais par contre affectaient sa capacité de liaison à l'ADN (Delany *et al.*, 2002). Les résidus D98 et H99 chez HpFUR sont équivalents aux résidus D88 et H89 chez EcFUR^{††} et PaFUR.

D88 et H89 chez PaFUR correspondraient respectivement à un des ligands de son site de régulation et de son site structural. H89, chez EcFUR correspondrait à un ligand de son site de régulation. Il a par ailleurs été montré qu'un mutant de ce résidu chez EcFUR était inactif (Braun *et al.*, 1990) comme pour HpFUR.

Au regard des données existantes, il a été proposé que les résidus D98 et H99 soient des ligands potentiels du site de régulation chez HpFUR (Delany *et al.*, 2002).

Aucune information relatant la présence d'un site structural chez HpFUR n'existe dans la littérature. Cependant il est à noter qu'HpFUR présente un motif de type CX₂C-n-CX₂C. Un tel motif CX₂C a été identifié chez EcFUR, les résidus C92 et C95 qui sont conservés chez HpFUR, appartiennent au site structural à zinc. Un motif de type CX₂C-n-CX₂C a également

^{††} La numérotation des résidus chez EcFUR varie selon que la méthionine M1 soit ou non considérée. Les résidus D88 et H89 chez EcFUR correspondent aux résidus D89 et H90 d'EcFUR sur l'alignement de séquence de la [Figure V.2](#).

été identifié chez certaines FUR-like comme MtZUR (Lucarelli *et al.*, 2007) et BsPerR (Traore *et al.*, 2006). Les cystéines de ce motif seraient également les ligands du site structural à zinc de ces protéines. Existe-t-il alors un site structural à zinc chez HpFUR ? si oui, comprend-il 2 ou 4 cystéines ?

La caractérisation des sites métalliques potentiels chez HpFUR sera intéressante.

V.2.3. La régulation transcriptionnelle par HpFUR.

Le fait qu'HpFUR puisse partiellement compléter une bactérie *E.coli* dépourvue de protéine FUR pour faire face au stress métallique « Fe(II) », implique que cette dernière puisse reconnaître un motif de liaison à l'ADN similaire à EcFUR et fonctionne en partie comme celle-ci. HpFUR est, en effet, un répresseur transcriptionnel dont la fonction est métal-dépendante (Bereswill *et al.*, 1999; Delany *et al.*, 2002; Ernst *et al.*, 2005a; Fassbinder *et al.*, 2000; van Vliet *et al.*, 2004). Cependant ce n'est pas son unique mode d'action. HpFUR peut agir certes en tant que répresseur (Delany *et al.*, 2001a; Delany *et al.*, 2001b; Delany *et al.*, 2002; Ernst *et al.*, 2005b) mais aussi en tant qu'activateur (Alamuri *et al.*, 2006; Delany *et al.*, 2003). Ses modes de régulation seraient également dépendants de l'activation de la protéine par le métal. D'après les études faites par Delany *et al.*, HpFUR apo et holo peuvent se lier à l'ADN.

HpFUR, peut être qualifiée de régulateur global, elle contrôle l'expression de gènes impliqués dans :

- le métabolisme du fer comme *pfr*, *fecA1*, *fecA2*, *frpB1*, *nifS*, *fur* (Ernst *et al.*, 2005a)
- le stress oxydant comme *sodB*, *cat*, *nap* (Ernst *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2006)
- l'adaptation au stress acide comme *amiE*, *amiF*, *arsR*
- le métabolisme et l'homéostasie du Ni(II) comme *hydABC*, *hpn-like*, *nikR* (?)

Ses régulations s'entrecroisent avec celles faites par ArsRS et par NikR qui sont les deux autres principaux régulateurs chez *H. pylori*.

Si l'on considère le fait que la liaison du métal dans le site de régulation impose des changements conformationnels, cela implique qu'HpFUR puisse lier l'ADN avec deux conformations différentes. Les sites de liaison à l'ADN ou l'affinité pour ceux-ci peuvent également différer en fonction de la conformation de la protéine.

Les différents modes de régulation d'HpFUR vont être présentés par la suite.

V.2.3.1. Répression de la transcription par HpFUR métallée

Ce mode de régulation semble le plus classique pour HpFUR. Cette dernière réprime l'expression de nombreux gènes comme *amiE*, *fecA3*, *exbB*, *frpB1* (Ernst *et al.*, 2005a) en présence de métal.

Le groupe de V. Scarlato a montré en 2001, par la technique des empreintes à la DNaseI qu'HpFUR métallée était en mesure de se lier sur le promoteur du gène codant pour FrpB1 (*frpB* boxI : -1 à -42 par rapport au TSP) (Delany *et al.*, 2001a; Delany *et al.*, 2001b).

Cette protéine est un récepteur de sidérophores TonB-dépendant situé dans la membrane externe. La liaison d'HpFUR métallée réprime la transcription du gène *frpB1* et réprime donc *in fine* la synthèse de récepteur membranaire capable de lier les sidérophores qui acheminent du fer dans la bactérie. Ce mécanisme permet à la bactérie de contrôler sa concentration intracellulaire en fer en limitant son importation.

V.2.3.2. Répression de la transcription par Apo-HpFUR

De nombreux gènes semblent également réprimés par HpFUR non pas métallée mais apo (Ernst *et al.*, 2005a), parmi lesquels *hydABC* qui constituent l'hydrogénase NiFe, *pfr* qui code pour la ferritine (protéine de stockage du fer) ou encore *sodB* qui code pour la superoxyde dismutase à fer. Ce mode de régulation a été mis en évidence pour la première fois lors de l'expression fer-dépendante de la ferritine. En absence de fer, son expression était réprimée alors qu'en présence de fer ou pour un mutant FUR, l'expression de la ferritine avait lieu (Bereswill *et al.*, 2000). Il a été montré par la technique des empreintes à la DNaseI, qu'Apo-HpFUR se liait sur trois séquences opératrices dont une recouvre le promoteur *ppfr* (*pfr* BoxI +5 à -36 par rapport au TSP).

Ces séquences opératrices présentent plusieurs motifs $AT(\frac{A}{T})AT$ (Delany *et al.*, 2001b).

L'addition de fer tend à limiter la liaison de la protéine sur ces motifs. HpFUR métallée est moins affine pour ses 3 séquences opératrices. Il en résulte donc *in vivo* une activation de la transcription du gène codant pour la ferritine par le fer. La comparaison de ces séquences opératrices à la séquence opératrice liée par FUR métallée sur *ppfrB* montre une organisation légèrement différente de la BoxI. *Pfr* et *frpB* BoxI contiennent deux hexamères parfaits $AT(\frac{A}{T})AT$, mais dans le cas de *FrpB*, ces motifs sont consécutifs alors qu'ils sont séparés par deux hexamères imparfaits pour *pfr* BoxI. Cette différence pourrait modifier l'affinité d'une forme apo ou non pour l'ADN (Delany *et al.*, 2001a; Delany *et al.*, 2001b).

L'expression de la SOD à fer (SodB) est dépendante du même mécanisme (Ernst *et al.*, 2005b). SodB est impliquée dans la lutte contre le stress oxydant, en réalisant la dismutation de l'ion superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est pris en charge par la catalase. HpFUR apo ne lie qu'un seul motif (-5 à -47 par rapport au TSP) avec une affinité faible (Kd 260nM). Le motif lié ne présente que peu de similitude avec les pfr box. Le mode de régulation de l'expression de SodB par FUR chez *H.pylori* diffère nettement du mécanisme mis en jeu pour contrôler son expression chez *E.coli*. En effet chez cette dernière, EcFUR métallée contrôle indirectement l'expression positive de la SodB en réprimant l'expression de petits ARN anti-sens (RhyB) (Masse & Gottesman, 2002).

Chez *E.coli*, aucune régulation par la forme apo de FUR n'a jusqu'à présent été démontrée ni même supposée. Cette dernière est considérée comme inactive à l'état apo. Sa conformation ne lui permet pas de se lier à l'ADN. Il est possible que les conformations d'EcFUR et HpFUR apo diffèrent, mais aucune information concernant la structure d'HpFUR n'existe.

Ces deux protéines bien qu'appartenant à la même famille présentent des différences de fonctionnalités significatives liées sans doute à des différences structurales qu'il serait intéressant de caractériser.

V.2.3.3. Activation de la transcription par HpFUR métallée

Au cours d'une étude de transcriptomique (Ernst *et al.*, 2005a), il a été montré qu'HpFUR (WT) métallée était capable d'activer la transcription de certains gènes. Ce mode de régulation semblait atypique pour le « répresseur » FUR. Il a donc été proposé que cette régulation ait lieu par un mécanisme indirect (comme pour la SodB chez *E.coli*). Jusqu'à présent aucun mécanisme de la sorte n'a été mis en évidence. Au contraire, dernièrement, il a été montré qu'HpFUR métallée était capable d'activer directement la transcription du gène *nifS* en liant deux motifs en amont du promoteur (-155 à -190 et -210 à -240pb) avec un Kd de 360nM (Alamuri *et al.*, 2006). Ces motifs sont similaires à ceux protégés par HpFUR apo pour *ppfr* et *psodB*, cependant HpFUR apo ne semble pas pouvoir s'y lier.

V.2.3.4. Autorégulation d'HpFUR

HpFUR semble en mesure de contrôler très finement sa propre expression transcriptionnelle (Figure V.4). Cependant le mécanisme de régulation, qui a été suggéré, repose sur des expérimentations faites avec des protéines non natives (Tag histidine en C-ter) (Delany *et al.*, 2002), il reste à confirmer avec une protéine sauvage.

HpFUR peut en fonction des conditions métalliques soit activer, soit réprimer sa transcription. Un rétrocontrôle est assuré par HpFUR de façon Fe(II) dépendante. HpFUR-Fe lie trois sites nommés OI, OII et OIII pour lesquels l'affinité est décroissante (Delany *et al.*, 2002). Le site OI est positionné entre le nucléotide -34 et -66 par rapport au TSP. Le site OII, quant à lui, est positionné entre le nucléotide +19 et -13 par rapport au TSP. Enfin le site OIII recouvre la région -87 à -140. Chacun de ces motifs est séparé par 21 nucléotides.

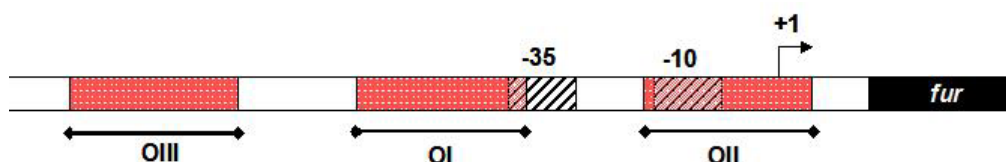


Figure V.3 Schéma sur lequel figure la localisation des sites liés par HpFUR dans sa région promotrice. HpFUR lie trois sites : OI, OII et OIII pour lesquels l'affinité est décroissante. Le TSP est indiqué par une flèche.

Deux mutants d'HpFUR D98G et H99I qui ne peuvent plus réprimer leur propre expression en présence de métal, sont toujours capables de lier certains sites opérateurs. Le mutant H99I lie toujours le site OIII à haute concentration et le mutant D98G lie toujours le site OI et à haute concentration le site OIII. Les mutations des résidus D98 et H99 affectent l'affinité de la protéine pour l'ADN et sans doute leur spécificité de reconnaissance. Le site OII et donc OI (par considération des affinités) jouent un rôle important dans le mécanisme de répression de son gène par HpFUR métallée.

La régulation de l'expression transcriptionnelle de *fur* par elle-même est plus complexe. Il semblerait qu'un mécanisme d'anti-répression existe. Un modèle complexe a été proposé (Figure V.4) après que certaines caractéristiques des sites en amont du promoteur (OI et OIII) aient été étudiées (Delany *et al.*, 2003).

Le site OI permettrait de réguler finement la concentration intracellulaire en FUR. Ce site OI qui chevauche très partiellement la boîte -35 serait non seulement un site opérateur de haute affinité pour HpFUR mais aussi un « UP élément ». Ce genre de motif riche en AT et situé en amont du motif -35 permet d'augmenter le taux de transcription du gène en interagissant avec le domaine C-ter de la sous unité α de l'ARN polymérase. HpFUR en se positionnant sur ce site bloquerait l'activation par l'« UP élément ».

Le site OIII, quant à lui, serait plutôt impliqué dans le mécanisme d'anti-répression de la transcription du gène *fur* par HpFUR apo (Delany *et al.*, 2003).

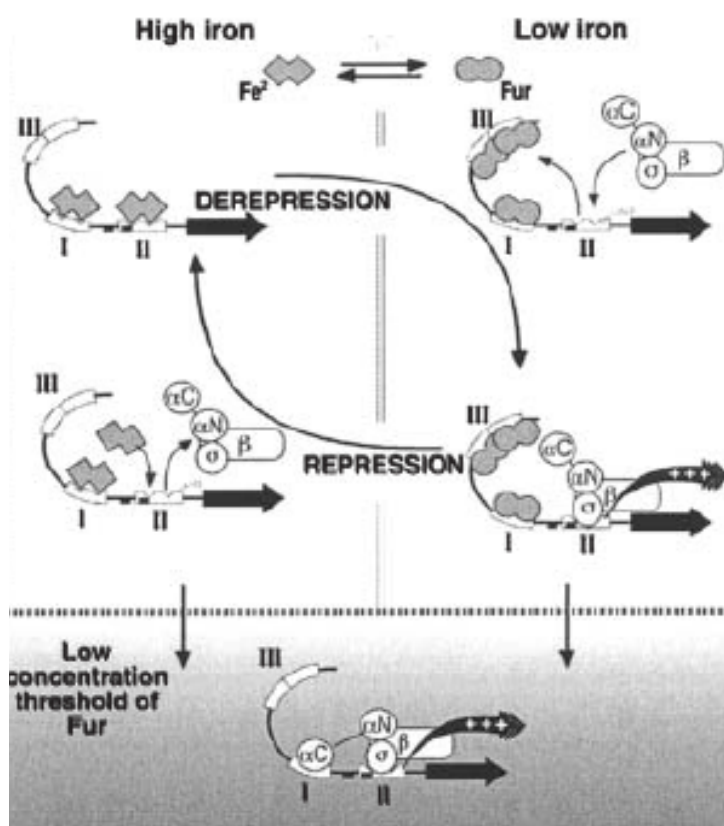


Figure V.4 Modèle de régulation de l'expression transcriptionnelle de fur par HpFUR (tiré de (Delany *et al.*, 2003)). En présence de fer, HpFUR métallée peut lier le site OI et OII et donc réprimer la transcription de fur. La concentration intracellulaire en protéine tend à décroître, ce faisant HpFUR métallée entre petit à petit en compétition avec l'ARN polymérase pour le site OII puis pour le site OI. Ce dernier dépourvu de protéine peut alors se comporter comme un « UP élément » et donc faciliter la transcription et maintenir un niveau minimum en protéine. La dérépression de la transcription a lieu lorsque le milieu devient déficient en fer. La conformation d'HpFUR change en perdant du métal. HpFUR apo ne se lie plus à OII mais a par contre une bonne affinité pour OIII. HpFUR apo reste liée à OI mais par un mécanisme différent, puisque sa conformation a dû changer. La transcription peut de nouveau avoir lieu. Le site OI présente un double rôle : site de répression pour HpFUR métallée (et apo) et « UP élément », le site OII est impliqué dans la répression de la transcription par HpFUR métallée et le site OIII est impliqué dans l'anti-répression par HpFUR apo.

Les mécanismes de régulation de l'expression transcriptionnelle utilisés par HpFUR, pour maintenir entre autres l'homéostasie du fer dans la bactérie, présentent un degré de complexité supplémentaire qui n'existe pas pour EcFUR. HpFUR « métallée ou apo » régule en activant ou en réprimant directement l'expression de ses gènes. Le mécanisme d'activation d'HpFUR au niveau moléculaire n'est pas encore élucidé.

Afin d'étudier le mécanisme d'activation d'HpFUR pour sa liaison sur la région intergénique *nikR-exbB*, sa caractérisation biochimique a dans un premier temps été faite pour éclaircir certaines zones d'ombre (état oligomérique initial, contenu métallique, capacité de métallation, effet du métal sur la protéine ?).

V.3. Purification d'HpFUR WT

La protéine FUR d'*Helicobacter pylori* a été obtenue à partir d'une souche BL21(DE3) d'*E.coli* surproductrice et a été purifiée selon un protocole original qui diffère de ceux proposés préalablement dans la littérature.

Les protocoles décrits consistent en l'utilisation d'une colonne d'affinité chargée en Ni(II), la Ni-NTA de QIAGEN (Bereswill *et al.*, 1999; Delany *et al.*, 2001a; Delany *et al.*, 2001b) où la protéine porte initialement un tag histidine en N-ter ou C-ter qui est clivé ou non par la suite.

V.3.1. L'obtention des extraits protéiques

Le gène *fur* a été cloné dans un plasmide pET11a où il est sous contrôle d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase du phage T7. La construction plasmidique a été réalisée par Kristine Schauer en thèse à l'Institut Pasteur (Paris). Ce plasmide contient un gène conférant la résistance à l'ampicilline. Le plasmide construit, nommé pFUR3, a été introduit par choc thermique dans la souche surproductrice d'*E.coli* BL21(DE3). Cette dernière synthétise l'ARN polymérase du phage T7 qui est sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. La surproduction d'HpFUR est *in fine* induite (Figure V.5).

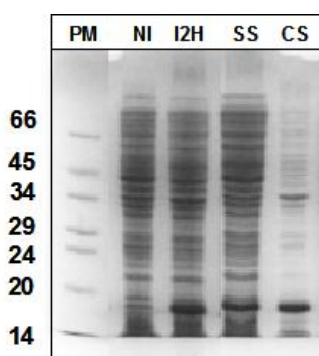


Figure V.5 Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes montrant la production de FUR d'*Helicobacter pylori* dans une souche BL21(DE3) d'*E.coli* inducible à l'IPTG. NI : profil protéique de la culture bactérienne avant induction ; I2H : profil protéique de la culture bactérienne après 2H d'induction à l'IPTG 0.5mM à 37°C ; SS : profil protéique du surnageant après cassage des cellules dans 20 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, Inhibiteurs de protéases ; CS : profil protéique des débris cellulaires culotés après cassage des cellules. Une partie non négligeable de la protéine reste dans le culot.

Afin de limiter la protéolyse de la protéine, trois inhibiteurs de protéases (le PMSF, la Pepstatine A et l'ICT) ont été ajoutés dans la suspension bactérienne avant le cassage des cellules par sonication. Entre 30 et 50% de la protéine sont récupérés après cette étape (étape limitante dans la production d'HpFUR).

V.3.2. Purification sur une colonne échangeuse de cations

HpFUR est une protéine riche en résidus basiques (Arg : 10 Lys : 16 vs résidus acides : 23) qui lui confèrent un point isoélectrique théorique de 8,50 (Swiss prot). Tenant compte de cette propriété, la protéine a donc été purifiée sur une colonne échangeuse de cations SP sépharose (SP : Sulfopropyl) équilibrée avec un tampon 20mM HEPES pH 7.4 210 mM NaCl. Au préalable, l'extrait protéique est dialysé afin de le dessaler (NaCl 500mM à 100mM dans un tampon à pH7.4) et traité avec la DNaseI pour dégrader l'ADN. Dans ces conditions de pH, HpFUR, contenue dans le dialysat, est théoriquement chargée positivement et donc est retenue sur la colonne qui présente des groupements $-SO_3^-$. L'ADN est, quant à lui, non retenu. L'élution d'HpFUR est permise par un gradient en NaCl allant de 210 à 640 mM (Figure V.6). L'ion sodium sert de contre ion qui entre en compétition avec la protéine pour interagir avec le groupement $-SO_3^-$.

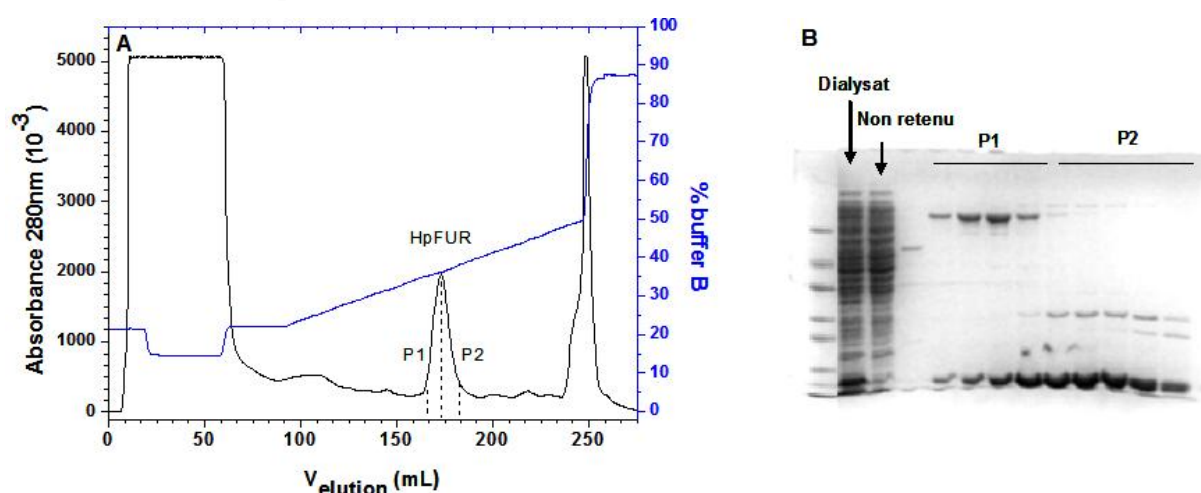


Figure V.6 A) Profil de purification d'HpFUR sur une colonne échangeuse de cations (SP Sépharose), le pic d'élution d'HpFUR est séparé en 2 lots : Pool 1 (P1) et Pool 2 (P2). B) Profil de purification visualisé sur SDS-PAGE à 17% en acrylamide.

HpFUR est totalement retenue sur la colonne ; son pic d'élution est séparé en deux pools qui contiennent des niveaux d'impuretés différents (Figure V.6). La protéine prépurifiée est ensuite concentrée avant de connaître la seconde étape de purification.

V.3.3. Purification par filtration sur gel

En sortie de colonne échangeuse de cations, HpFUR est à 70% pure, les 30% d'impuretés restantes sont éliminées par une étape d'exclusion moléculaire. La purification est réalisée sur une colonne Superdex 75 préparative (16/60 GE Healthcare).

La [Figure V.7](#) présente les profils d'élution des pools P1 et P2 obtenus au cours de l'étape de filtration sur gel. HpFUR ne présente qu'un état oligomérique (pic unique d'élution) et est élue vers 58 mL.

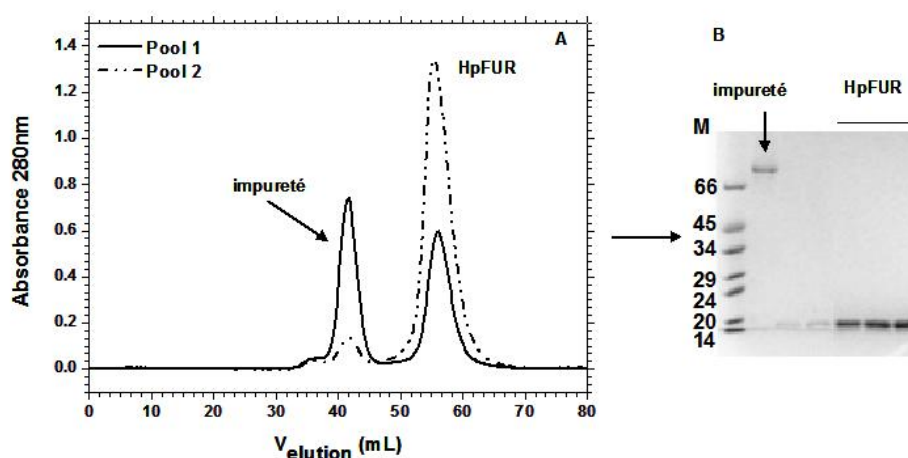


Figure V.7 A) Profil de purification d'HpFUR sur une colonne d'exclusion moléculaire (Superdex 75 préparative) équilibrée dans un tampon 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 400mM NaCl, 5 mM DTT à 1mL.min⁻¹ à 5°C. B) Gel SDS-PAGE à 17% en acrylamide montrant le profil de purification du pool 1.

L'analyse par SDS-PAGE montre que la protéine « HpFUR » est pure et présente un poids moléculaire apparent compris entre 14 et 20kDa, une espèce protéique de 14kDa est également observable de façon aléatoire (rapidité d'exécution de la purification) ([Figure V.8](#)). L'analyse par spectrométrie de masse faite par D. Lascoux du LSMP de l'IBS Grenoble a révélé que le poids moléculaire de la protéine purifiée était de 17680 Da ce qui correspond au PM théorique d'HpFUR de 17681 Da. Une espèce protéique de 4498 Da a également été identifiée. Cette espèce pourrait correspondre à une espèce protéolysée d'HpFUR dont la perte aboutirait à l'obtention de l'espèce visualisée sur gel ([Figure V.8](#)).

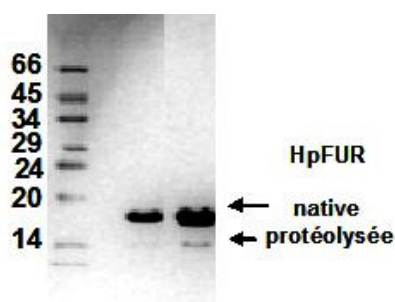


Figure V.8 SDS-PAGE d'HpFUR purifiée. Cette dernière est susceptible d'être protéolysée en Cter avec une perte d'une trentaine de résidus.

Le séquençage du N-ter, des 2 espèces protéiques visualisées sur gel, a été réalisé par J.P. Andrieu de l'IBS Grenoble et a révélé que ces deux espèces correspondaient bien à HpFUR. Cette dernière présente toujours sa méthionine M1. L'espèce protéolysée d'HpFUR le serait dans son extrémité C-ter.

Entre 10 et 30 mg de protéine pure pour 3 L de culture sont obtenus après toutes les étapes de purification. L'épsilon théorique à 280 nm considéré pour évaluer la concentration par sous unité monomérique est de $11460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Expasy Swiss Prot). Un spectre d'absorption UV-Vis d'HpFUR apo à $20 \mu\text{M}$ est présenté ci-dessous.

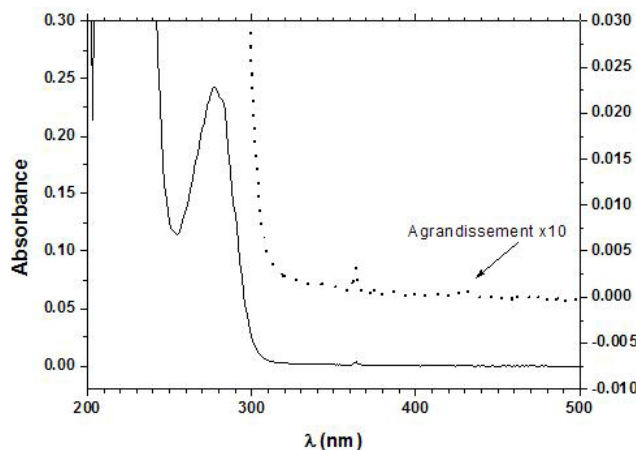


Figure V.9 Spectre d'absorption UV-Vis d'HpFUR apo à $20 \mu\text{M}$ dans un tampon 20mM Tris/HCl pH7.4 400mM NaCl, 1mM DTT.

Des essais de cristallisation d'HpFUR apo ont été réalisés par nos collaborateurs de l'ESRF (L. Terradot et U. Kapp) mais n'ont pas encore abouti.

V.4. Etat d'oligomérisation d'HpFUR WT

L'état oligomérique d'HpFUR a été déterminé par mesure du poids moléculaire de l'espèce purifiée sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique (superdex 75_ 10/30 GE Healthcare). Cette dernière a, au préalable, été calibrée avec des protéines de forme sphérique et de densité proche : l'albumine bovine, l'ovalbumine, le chymotrypsinogène et la ribonucléase A (Figure V.10). Si HpFUR n'est pas sphérique ou si sa densité est différente de celle des standards utilisés alors le poids moléculaire apparent sera différent du poids réel.

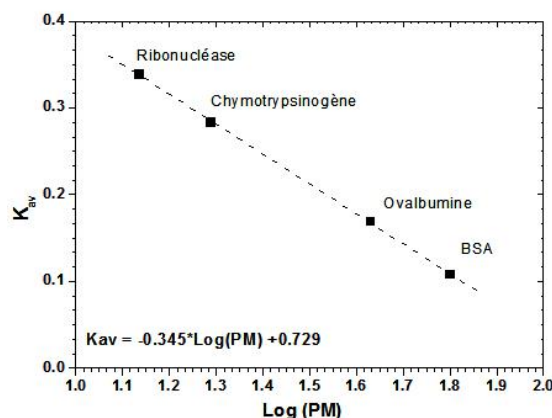


Figure V.10 Courbe de calibration de la Superdex 75 analytique réalisée avec des protéines sphériques dans du 20mM MOPS pH 7 KCl 400mM à 20°C. $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$, où V_t est le volume total de la colonne soit 23.6 mL, V_o est le volume mort qui correspond au volume d'élution du bleu Dextran soit 7.6 mL et V_e est le volume d'élution des protéines.

La protéine en sortie de purification a été concentrée puis injectée sur la colonne analytique. Avant l'injection le tampon de la protéine a été échangé. HpFUR est mise dans du 20 mM MOPS pH 7 400mM KCl. Ce tampon qui correspond au tampon de calibration de la Superdex analytique, a également été choisi pour faciliter les études des changements conformationnels de la protéine en fonction des métaux qui seront présentées par la suite.

Un seul état oligomérique de la protéine est observé sur le chromatogramme (Figure V.11). Le volume d'élution est de 10,6 mL ce qui correspond à un poids moléculaire apparent de 37 kDa. En théorie les poids moléculaires d'HpFUR monomérique et dimérique sont respectivement de 17,7 et 35,4 kDa. HpFUR purifiée est donc un dimère. Des résultats préliminaires, obtenus par des mesures de spectrométrie de masse faites en conditions natives, confirment cela. La présence d'une espèce monomérique a également été notée dans certaines conditions mais cela reste à confirmer. Elle pourrait expliquer pourquoi le pic d'élution d'HpFUR traîne légèrement sur le chromatogramme (Figure V.11)

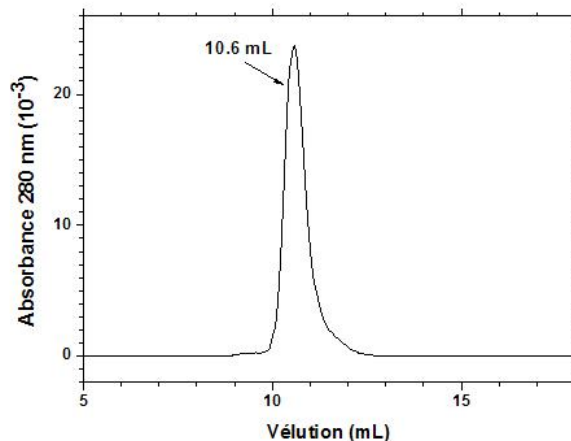


Figure V.11 Profil d'élution d'HpFUR à 25μM obtenu sur une colonne d'exclusion moléculaire équilibrée dans du 20mM MOPS pH 7 400mM KCl à 20°C.

Lorsqu'un traitement de la protéine à basse concentration (25 μM) avec un excès d'EDTA (250 équivalent/unité monomérique de protéine) à 4 °C est réalisé, le profil d'élution d'HpFUR évolue dans le temps. Après 2h de traitement, HpFUR est majoritairement élue à 11.6 mL, ce qui correspond à un poids moléculaire apparent de 24 kDa. Ce poids tend à s'approcher du poids théorique de la forme monomérique d'HpFUR. Une telle espèce a été

identifiée et caractérisée pour EcFUR (D'Autreaux *et al.*, 2007; Pecqueur *et al.*, 2006). L'EDTA aurait chélaté un métal impliqué dans la dimérisation de la protéine.

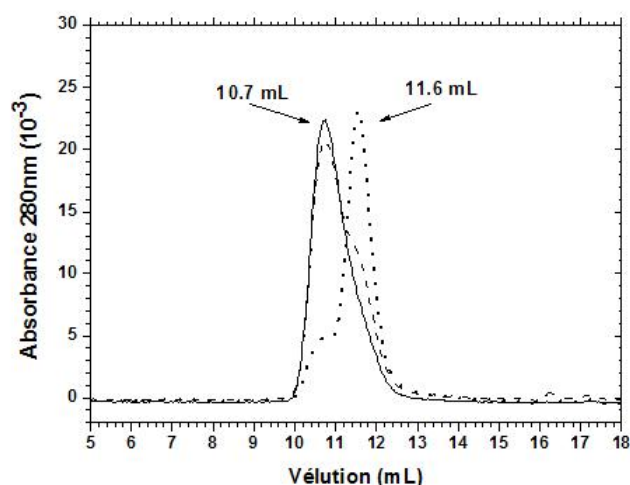


Figure V.12 Profils d'élution d'HpFUR à 25 µM obtenus sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique équilibrée dans du 20mM MOPS pH 7 400mM KCl à 20°C. (—) sans EDTA, (---) avec de l'EDTA 250eq pendant 30 minutes, (···) avec de l'EDTA 250eq pendant 2 heures. Les poids moléculaires des espèces à 10,7 et 11,6 mL sont de 35 et 24kDa respectivement. HpFUR est un dimère qui peut redonner un monomère en présence d'EDTA.

HpFUR est nativement un dimère qui semble contenir du métal impliqué dans le processus de dimérisation de la protéine. Le contenu métallique doit être analysé.

Le processus de dimérisation doit également dépendre de la concentration protéique. Il serait intéressant de déterminer la constante de dissociation de cette espèce.

V.5. La liaison du métal par HpFUR

V.5.1. HpFUR purifiée est métallée

Le contenu métallique d'HpFUR après purification a été déterminé en utilisant deux techniques : un dosage colorimétrique avec du PAR qui n'est pas spécifique d'un métal de transition et la spectrométrie d'absorption atomique.

V.5.1.1. Dosage par le PAR

La mesure du contenu métallique a été faite à deux reprises sur un échantillon de 20 et 63 µM de protéine ayant subi au préalable une dénaturation par le TCA afin de rendre accessible le métal au PAR. Le dosage ainsi réalisé est comparé à une courbe de calibration mesurée le jour même avec le zinc complexé au PAR (Figure V.13). HpFUR en sortie de purification contient entre 0,6 et 0,7 équivalent de métal par sous unité monomérique si la concentration en protéine déterminée avec l'épsilon théorique est considérée. *A priori* ce métal pourrait être du

zinc puisque ce dernier ne confère aucune caractéristique en spectroscopie d'absorption UV-Visible.

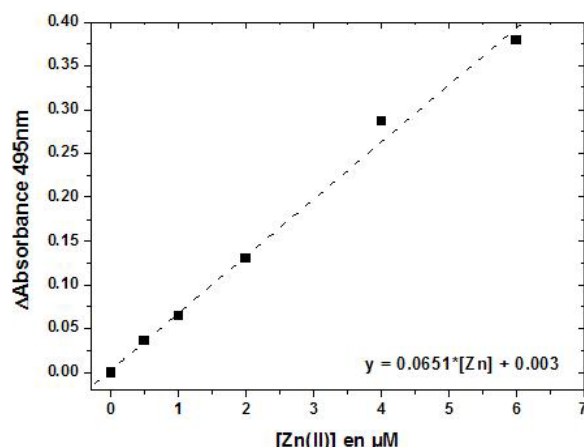


Figure V.13 Gamme étalon du zinc complexé au PAR en fonction de la concentration en zinc ajouté mesurée dans du 1M Tris/HCl pH 7.4 à 20°C.

V.5.1.2. Dosage par spectroscopie d'absorption atomique

Le dosage a été réalisé par le Dr. Josiane Arnaud rattachée au Département de biologie intégrée du CHU de Grenoble.

La mesure du contenu métallique a été faite sur deux lots de purification d'HpFUR. Le tampon de ces dernières a au préalable été échangé contre du 20 mM Tris/HCl pH7,4. L'absence de métal dans le tampon a également été contrôlée. En moyenne HpFUR contient 1 équivalent de Zn(II) par monomère (Tableau V-2).

	Ech 1	Ech 2
[HpFur] _i en µmol.L ⁻¹	48	35
[Zn(II)] en µmol.L ⁻¹	44	38.2
N equ de Zn/monomère	0.91	1.09

Tableau V-2 Dosage par spectroscopie d'absorption atomique du contenu métallique d'HpFUR. La concentration protéique a été mesurée par spectroscopie d'absorption UV-Vis à 280nm.

Ce dosage confirme les données obtenues lors du dosage PAR, HpFUR en sortie de purification contient bien du métal et plus précisément 1 équivalent de Zn(II) par unité monomérique et la protéine est un dimère. Sachant qu'au cours de la purification, aucun traitement par le zinc n'a été réalisé, cela sous-entend que ce métal est propre à la protéine. Par analogie à FUR d'*E.coli*, HpFUR purifiée contient du zinc contenu sans doute dans le site structural (ou site 1). Ce site serait impliqué dans le processus de dimérisation de la protéine. L'absence de métal sur cette forme « monomérique » doit néanmoins encore être confirmée. Cette espèce protéique métallée au zinc sera par la suite qualifiée de protéine « APO ».

Le contenu métallique de la protéine HpFUR purifiée, dont l'obtention est décrite dans la littérature, n'a pas été précisé. Cependant cet aspect semble important, puisque les propriétés de liaison à l'ADN de cette protéine sont fonction de la présence ou non de métal lié à la protéine.

En supposant que la protéine décrite dans la littérature comme étant « Apo » est identique à la protéine « Apo » que nous proposons, alors HpFUR présenterait un autre site métallique dont la métallation modifierait le mode d'action de la protéine : liaison ou non à l'ADN en fonction de la séquence opératrice.

V.5.2. La métallation d'HpFUR par le cobalt

Une reconstitution de la forme métallée ou « HOLO » d'HpFUR par du cobalt a été réalisée par Sylvia Vitale en 1^{ière} année de thèse au laboratoire. Le cobalt, comme cela a été précisé dans le chapitre III, est une sonde spectroscopique permettant de déterminer la géométrie du site métallique et de savoir si des cystéines sont ou non impliquées dans la coordination du métal et d'en estimer le nombre.

La métallation d'HpFUR au cobalt est suivie par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Des bandes spectrales sont notables à 308, 365, 485, 540 et 742 nm après les additions successives de cobalt (Figure V.14).

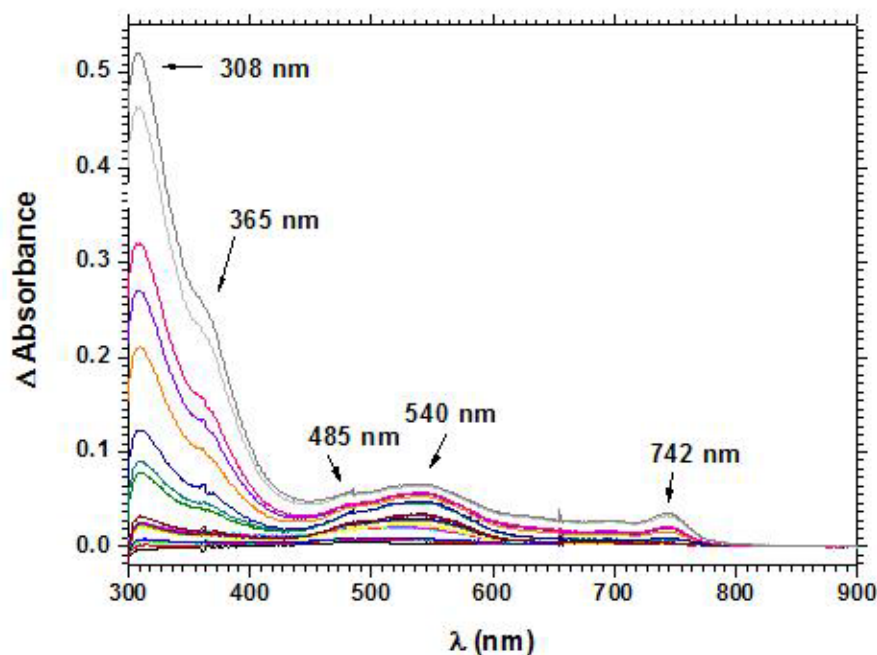


Figure V.14 Métallation d'HpFUR à 450 μ M par le cobalt. Spectres de différence entre Co-HpFUR et apo-HpFUR. Les différents équivalents de cobalt sont : 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1,0 ; 1,1 ; 1,2 ; 1,3 ; 1,4 ; 1,5 ; 1,6 ; 1,7 ; 1,8 ; 1,9 et 2,0eq. Conditions : 20mM HEPES pH 7,4, 1M NaCl 20°C. Sel métallique : CoSO_4 .

Cette métallation peut être dissociée en deux phases. La première phase a lieu entre 0 et 1,3 équivalents de cobalt ajoutés par monomère. Une première saturation de site est observée (plateau au-delà de 1,3 eq Co(II)/monomère). Deux bandes spectrales sont uniquement observées à 485 et 540 nm (Figure V.15A). Ce sont des bandes d-d de faible intensité. Le coefficient d'extinction molaire apparent de la bande à 540 nm est de $66 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Figure V.15B). La valeur de cet epsilon laisse présager que le site métallé par le cobalt est penta ou hexacoordonné. L'absence de bande de transfert de charge entre 300 et 400 nm caractérise l'absence de cystéine dans ce site. Ce site peut correspondre au site de régulation que l'on nommera site 2.

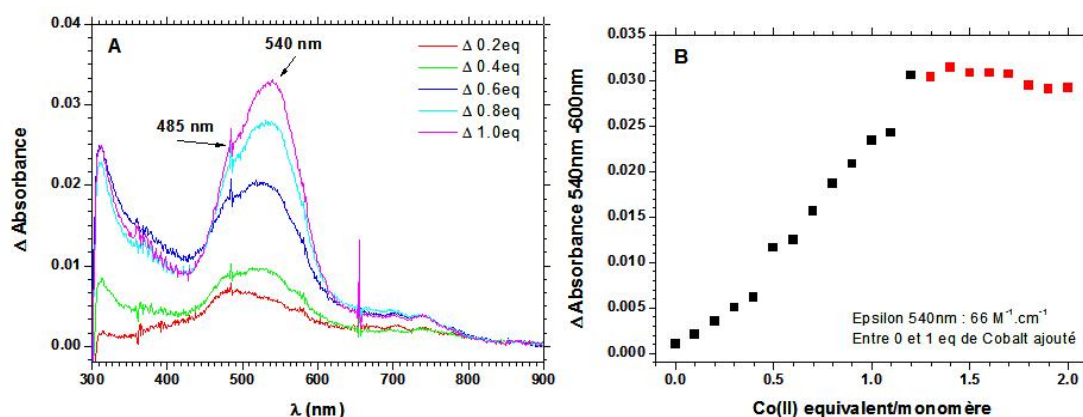


Figure V.15 Métallation d'HpFUR par le cobalt. A) Spectre de différence entre Co-HpFUR (1,0 ; 0,8 ; 0,6 ; 0,4 ; 0,2 eq de Co(II)) et apo-HpFUR. B) Titration d'HpFUR par le cobalt, suivi de l'absorption à 540 nm en fonction de la quantité de cobalt ajoutée. Conditions : 20 mM HEPES pH 7,4, 1 M NaCl 20°C. Sel métallique : CoSO_4 (Une métallation similaire a pu être réalisée dans un tampon 20 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl)

L'état oligomérique de la protéine métallée par 1,3 équivalents de cobalt est inchangé, HpFUR est toujours très majoritairement dimérique. Un faible pourcentage de forme monomérique et tétramérique est notable. (Figure V.16).

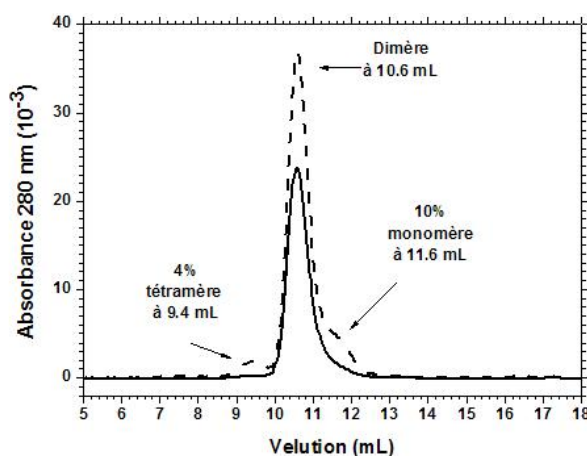


Figure V.16 Profils d'élution d'HpFUR (20 μM apo et 35 μM substituée au Co(II)) obtenus sur une colonne d'exclusion moléculaire analytique équilibrée avec du MOPS 20 mM pH 7 KCl 400 mM à 20°C. (—) Apo (— —) avec 1,3 eq de Co(II)

Au-delà de 1-1,3 équivalents de Co(II) ajoutés par monomère, une deuxième phase de métallation est observée avec l'apparition de nouvelles bandes à 308, 365 et 742 nm et la saturation de la bande à 540 nm (Figure V.17A). Les bandes à 308 et 365 nm de haute intensité sont caractéristiques de bandes de transfert de charge plus particulièrement entre le groupement thiolate S⁻ d'une cystéine et le cobalt. Le coefficient d'extinction molaire apparent de la bande à 308 nm et à 365 nm est de 1195 et 585 M⁻¹.cm⁻¹ respectivement (Figure V.17B). La coordination du cobalt par un soufre tend à donner un coefficient d'extinction molaire compris entre 900 et 1400 M⁻¹.cm⁻¹. La valeur de cet epsilon laisse présager que ce site (site X) implique dans la sphère de coordination 1 cystéine. La bande à 742 nm correspond à une bande d-d de faible intensité avec un coefficient d'extinction molaire apparent de 87 M⁻¹.cm⁻¹ (Figure V.17C). Bien que l'epsilon soit faible, sa localisation à 742 nm tend à être caractéristique d'un site tétracoordonné.

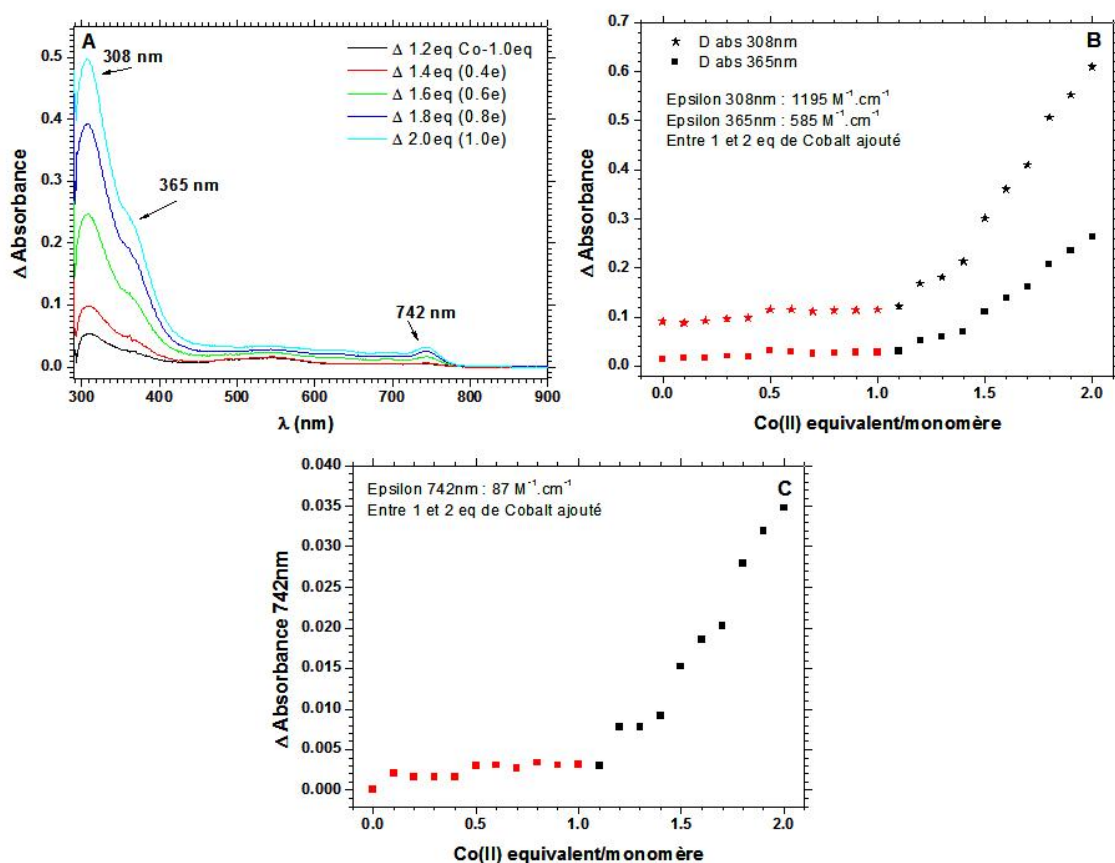


Figure V.17 Métallation d'HpFUR par le cobalt entre 1 et 2 équivalents ajoutés A) Spectres de différence entre Co-HpFUR (2,0 ; 1,8 ; 1,6 ; 1,4 ; 1,2 eq de Co(II)) et HpFUR 1eq Co(II). B) Titration d'HpFUR par le cobalt, suivi de l'absorption à 308 et 365 nm en fonction de la quantité de cobalt ajoutée. C) Titration d'HpFUR par le cobalt, suivi de l'absorption à 742 nm en fonction de la quantité de cobalt ajoutée. Conditions : 20mM HEPES pH 7.4, 1M NaCl à 20°C.

L'absence de saturation de métallation sous-entend que le site n'est pas « plein ». L'addition de plus de 3 équivalents de cobalt dans cette gamme de concentration de protéine (400-500 μ M) tend à la faire précipiter. La saturation de ce site n'a pas pu être réalisée.

Cette absence de saturation pourrait *in fine* influencer la valeur de l'épsilon déterminée si l'affinité du site pour le cobalt est dans la gamme de concentration protéique testée ou si le cobalt est en compétition avec un autre métal. En effet le cobalt pourrait éventuellement se substituer au zinc présent dans le site 1. Cependant HpFUR comprend 6 cystéines et le site 1 en contient au maximum 4. Le Co(II) pourrait également être coordonné par les 2 autres cystéines restantes par sous unité.

Dans ces conditions de métallation, l'état oligomérique est différent, des formes au minimum tétramériques sont observées. Cet état peut être réel avec la métallation d'un site entre deux dimères ou au contraire reflète la précipitation de la protéine à haute concentration.

Une caractérisation plus approfondie sera nécessaire pour répondre à ces différents points.

L'addition d'EDTA sur la forme métallée d'HpFUR avec 2 équivalents de cobalt tend à modifier l'allure des spectres avec la disparition « rapide » des bandes à 485 et 540nm (Figure V.18).

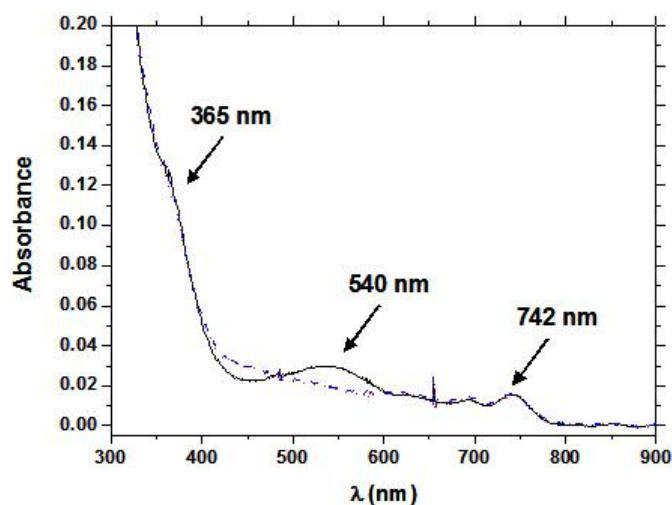


Figure V.18 Effet de l'EDTA sur la métallation d'HpFUR au cobalt suivi en UV-Visible. (—) HpFUR 2 eq Co(II), (---) avec de l'EDTA 45 eq < 20 sec, (.....) avec de l'EDTA 45 eq pendant 20 min. Conditions : 20mM HEPES pH 7.4, 1M NaCl 20°C.

L'EDTA chélate le cobalt du site 2 qui est éventuellement le site de régulation et pas le cobalt du site X. Le site X métallée au cobalt présenterait une plus haute affinité pour ce métal mais toutefois sa métallation est secondaire à la métallation du site 2. Elle n'est pas prioritaire. Une substitution du zinc contenu dans le site 1 par du cobalt pourrait expliquer ce comportement.

V.6. Effet du métal sur la conformation d'HpFUR

Deux techniques ont été employées afin d'observer les effets potentiels des métaux sur la structuration/conformation d'HpFUR dimérique « Apo » : des mesures de dichroïsme circulaire et des mesures de fluorescence du tryptophane.

V.6.1. Effet des métaux suivi par dichroïsme circulaire

V.6.1.1. Structuration de la protéine apo

Les spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV-lointain (195 – 250 nm) et dans l'UV-proche (250 – 320 nm) d'HpFUR « Apo » à 10 μ M ont été enregistrés dans du MOPS 20mM pH 7 KCl 40 mM (Figure V.19). Le spectre CD dans l'UV-lointain de la protéine FUR d'*Escherichia coli* « Apo » a été superposé sur la Figure V.19A.

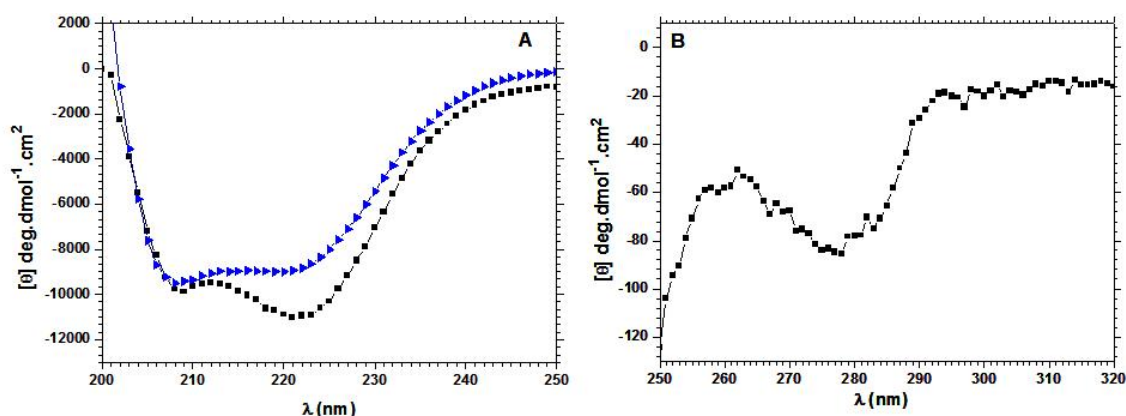


Figure V.19 A) Spectres CD enregistrés dans l'UV lointain d'Apo-HpFUR à 10 μ M (■) et d'Apo-EcFUR à 20 μ M (►). B) Spectre CD d'HpFUR enregistré dans l'UV proche. Les spectres ont été enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7, 40mM KCl à 25°C après 20 minutes d'équilibration. Le blanc est soustrait de chaque courbe expérimentale, les données ont été normalisées par rapport à la concentration et au nombre de résidus par monomère.

Le spectre du dimère d'HpFUR en UV-lointain comprend deux minima à 209 et 222 nm qui sont caractéristiques d'une structuration en hélice α . L'estimation de la structure secondaire n'a pas été réalisée. Toutefois, il est clair qu'HpFUR présente une structuration riche en hélice α bien que la prédiction de structure secondaire laissait envisager une structuration mixte (H α et feuillet β). Cette structuration diffère de celle d'EcFUR qui présente plutôt une structuration mixte (absence de minimum à 218 et 222nm). Cette différence pourrait être expliquée par la variation au niveau de l'hélice α 1. En effet, celle-ci tend à ne pas être structurée chez EcFUR à l'état de dimère non activée (Pecqueur *et al.*, 2006). D'après les prédictions, chez HpFUR, cette hélice serait plus longue et pourrait nativement être structurée même en absence de métal dans le site de régulation mais ceci reste à prouver.

L'effet de différents métaux (Co(II), Ni(II), Mn(II) et Zn(II)) sur la structure secondaire d'HpFUR a par la suite été mesuré.

Le spectre du dimère d'HpFUR en UV-proche comprend un minimum à 278nm. HpFUR présente bien une structure tertiaire avec une contribution principalement des tyrosines qui sont au nombre de 4 par unité monomérique. La contribution de l'unique tryptophane (par monomère) n'est pas notable.

V.6.1.2. Effets des métaux sur la structure secondaire

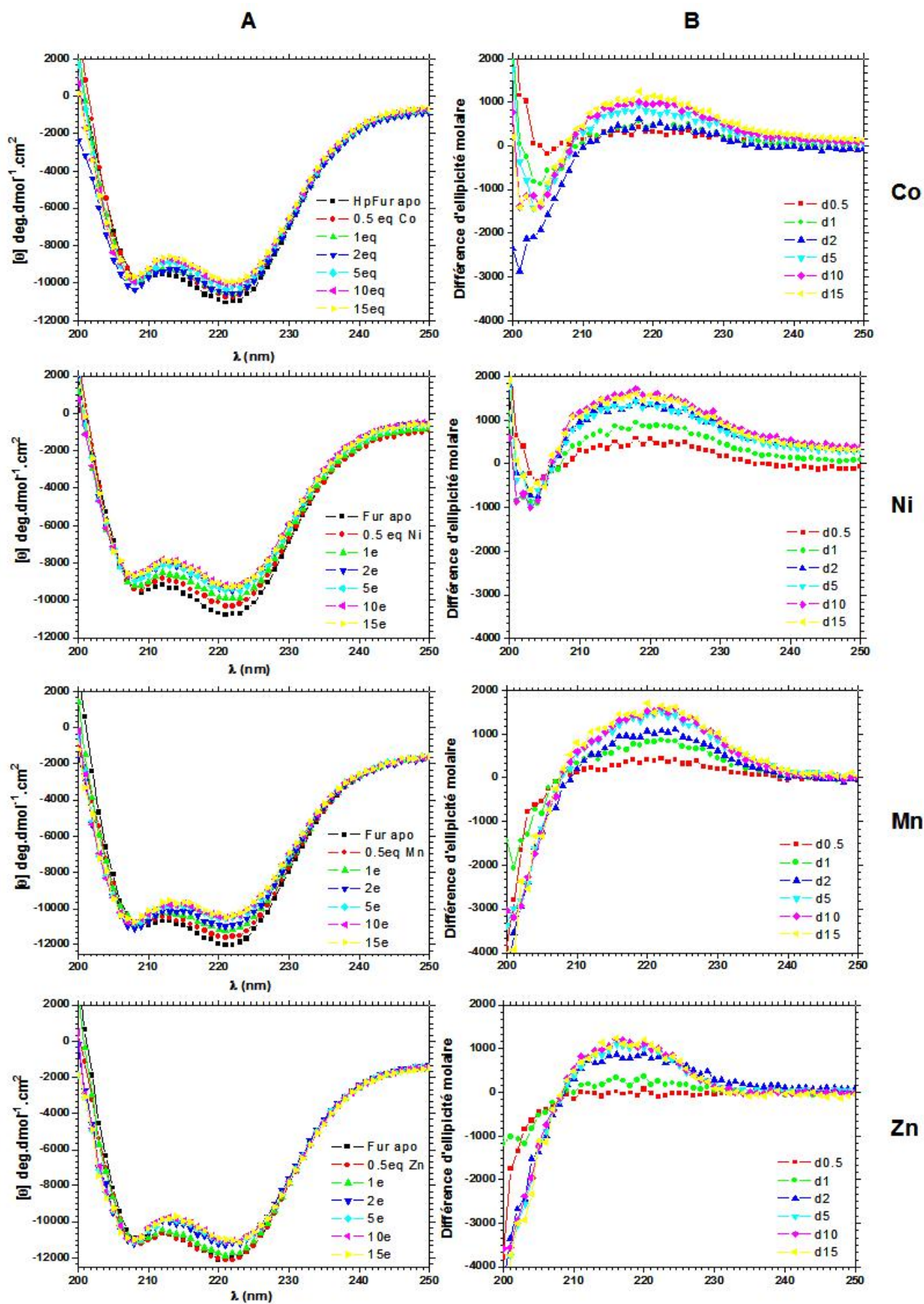
Les spectres de CD dans l'UV-lointain ont été enregistrés sur HpFUR apo et en présence de différents équivalents de métal qui ont été ajoutés progressivement dans l'échantillon.

Les spectres du dimère métallé par du Co(II), par du Ni(II), par du Mn(II) ou par du Zn(II) sont globalement similaires avec deux minima à 208 et 222 nm ([Figure V.20A](#)). L'ellipticité molaire du minimum à 222 nm est plus intense lorsque la protéine est métallée contrairement à l'ellipticité du dimère apo (ex : $[\theta]_{222}$ HpFUR-Co : $-9908 \text{ deg.mol}^{-1}.\text{cm}^2$ vs $[\theta]_{222}$ HpFUR-Apo : $-10954 \text{ deg.mol}^{-1}.\text{cm}^2$). L'ellipticité molaire à 212nm est plus marquée. L'ellipticité molaire du minimum à 208 nm ne fluctue pas par rapport à l'ellipticité molaire du minimum à 209 nm de la protéine apo sauf pour HpFUR-Ni et HpFUR-Co ([Figure V.20A](#)).

La protéine métallée avec les 4 métaux tend à conserver une structure en hélice α bien que des variations soient notables au travers des spectres de différence ([Figure V.20B](#)).

En effet l'addition de Co(II) ou de Ni(II) sur la protéine tend globalement à accroître l'ellipticité molaire entre 206 et 230 nm. Un point isobestique ou isodichroïque est observé à 206 nm pour le Ni(II). Il doit témoigner d'une transition entre deux états du dimère « apo à holo ». Cette transition semble terminée à partir de 5-10 équivalents.

Figure V.20 Effets du Co(II), Ni(II), Mn(II) et Zn(II) sur la structure secondaire d'HpFUR dimérique à 10 μ M. A) Spectres CD normalisés d'HpFUR apo et avec différents équivalents de métal (0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 15 eq/sous unité). Les spectres ont été enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7, 40mM KCl à 25°C. Le blanc est soustrait de chaque courbe expérimentale. B) Spectre de différence entre HpFUR métallée et HpFUR apo. (Sels métalliques : NiCl₂, MnCl₂, CoSO₄ et ZnSO₄). \Rightarrow



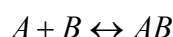
L'addition de Mn(II) provoque également une transition dont le point isodichroïque est à 208nm. La transition n'est pas de la même nature pour le Mn(II) que pour le Co(II) et le Ni(II). Cette transition semble terminée à partir de 5 équivalents. L'ellipticité molaire est augmentée en présence de Mn(II) avec un maximum centré sur 222nm.

L'addition de Zn(II) provoque également une transition plus tardive dont le point isodichroïque est à 208nm. Elle débute après l'addition de plus de 1 équivalent de Zn(II). L'affinité de la protéine pour ce métal dans ce site serait moins bonne ou impliquerait un mécanisme de coopérativité.

La transition diffère de nouveau par rapport aux trois autres métaux. Elle est également terminée à partir de 5 équivalents de Zn(II) ajoutés. L'ellipticité molaire est augmentée en présence de Zn(II) avec un maximum centré sur 218nm.

Ces variations d'ellipticité molaire en fonction des métaux montrent que ces derniers n'ont pas nécessairement le même effet sur la structure secondaire. La structuration de la protéine en présence de métal varie.

Des simulations peuvent être faites afin de déterminer la proportion « relative » de protéine métallée dans nos conditions en imposant des Kd de liaison du site métallique. La simulation repose sur le modèle « simple » suivant où :



Chaque unité monomérique d'HpFUR lierait 1 métal par sous-unité (métallation du site 2 ou site de régulation) et aucun mécanisme de coopérativité ne serait mis en jeu pour cette métallation.

La résolution de l'équation quadratique correspondante :

$$y = \frac{(Kd + Bt + At) - \sqrt{(Kd + Bt + At)^2 - 4 \times At \times Bt}}{2 \times At} \text{ où } y \text{ correspond à la fraction de protéine}$$

métallée, Bt correspond à la concentration totale en métal, At correspond à la concentration de protéine totale (soit 10µM ici) a permis de simuler la métallation d'HpFUR en considérant différentes valeurs de Kd pour le site de régulation (Figure V.21).

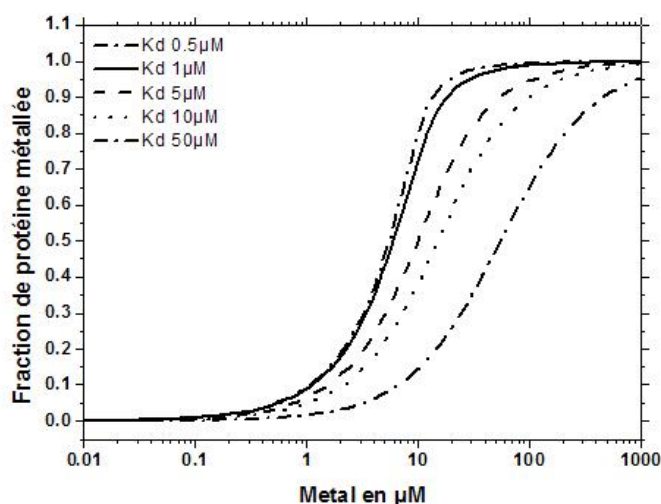


Figure V.21 Simulation de l'état de métallation d'HpFUR, en considérant un modèle de liaison métallique simple 1métal:1monomère (site 2). $[\text{HpFUR}]_1 = 10\mu\text{M}$ / $K_{d_{\text{Me}}}$ testé : 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 et $50\mu\text{M}$.

En considérant un K_d de métallation du site 2 de $1\mu\text{M}$, en présence de $10\mu\text{M}$ de métal (soit 1 équivalent par rapport à la concentration d'HpFUR), 75% de la protéine serait métallée. Plus de 90% de protéine serait métallée au-delà de 2 équivalents.

En supposant que le K_d de métallation du site 2 soit de $10\mu\text{M}$, alors en présence de $10\mu\text{M}$ de métal, 40 % de la protéine serait métallée. Plus de 90% de protéine serait métallée au-delà de 10 équivalents.

D'après ces simulations et les données expérimentales, il semblerait que le K_d de métallation du site 2 soit de l'ordre de $10\mu\text{M}$, en supposant que les changements de structure secondaire observés dépendent de la métallation de ce site.

Le spectre d'HpFUR concentrée métallée au Co(II) (notée holo-HpFUR) uniquement dans le site 2 (suivi en UV-Vis) a été enregistré. La protéine a été diluée dans un tampon 20mM MOPS pH7 20mM KCl pour s'approcher au maximum du tampon de référence MOPS 20mM KCl 40mM. Comme pour HpFUR (à $10\mu\text{M}$) métallée au Co(II) , une ellipticité molaire plus intense à 222 nm et à 212 nm pour Holo-HpFUR est observée. Le second minimum est également mesuré à 208nm.

Les changements observés au niveau de la structure secondaire sont bien associés à la métallation du site 2 ou de régulation.

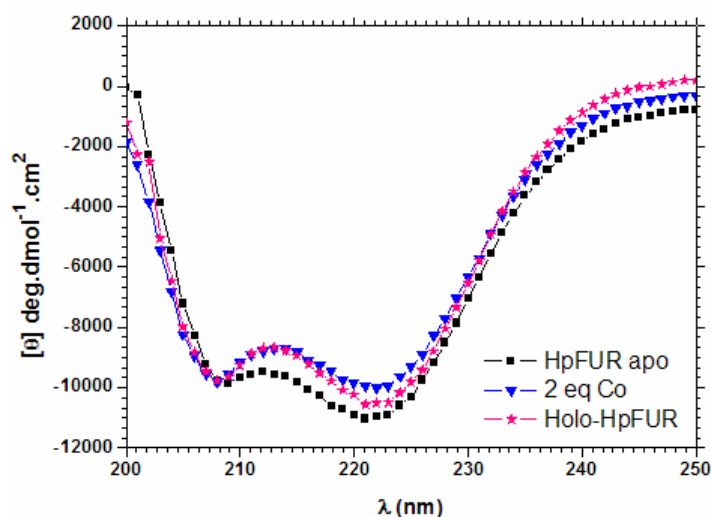


Figure V.22 Spectres CD enregistrés dans l'UV lointain d'Apo-HpFUR à 10 μ M (■), HpFUR à 10 μ M métallée avec 2 équivalents de Co(II) (▼), Holo-HpFUR (1.5eq Co(II)) concentrée puis diluée à 10 μ M (★). Les spectres ont été enregistrés dans du tampon 20mM MOPS pH7, 40mM KCl à 25°C après 20 minutes d'équilibration. Le blanc est soustrait de chaque courbe expérimentale (la correction pour Holo-HpFUR n'est pas parfaite, son tampon ne comprend pas exactement 40mM de KCl), les données ont été normalisées par rapport à la concentration et au nombre de résidus par monomère.

V.6.2. Effet des métaux suivi par la fluorescence du tryptophane

Le suivi de l'évolution de la fluorescence du tryptophane, renseigne sur l'environnement du tryptophane qui est présent à la fin du domaine C-ter de la protéine W141 (Figure V.2). En fonction de sa longueur d'onde maximale d'émission, il est possible d'évaluer si le tryptophane est enfoui dans la protéine (λ_{max} vers 310 nm) ou exposé au solvant (λ_{max} vers 350 nm) (Reshetnyak *et al.*, 2001).

V.6.2.1. Fluorescence d'HpFUR apo

Le spectre d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR apo à 3,6 μ M, enregistré dans du tampon MOPS 20mM pH7 KCl 150mM et du MOPS 20mM pH7 KCl 40mM, montre que ce dernier est partiellement exposé au solvant puisque le λ_{max} d'émission est de 344 et 343 nm respectivement (Figure V.23). La salinité n'influence pas ou très faiblement l'environnement des tryptophanes d'HpFUR apo.

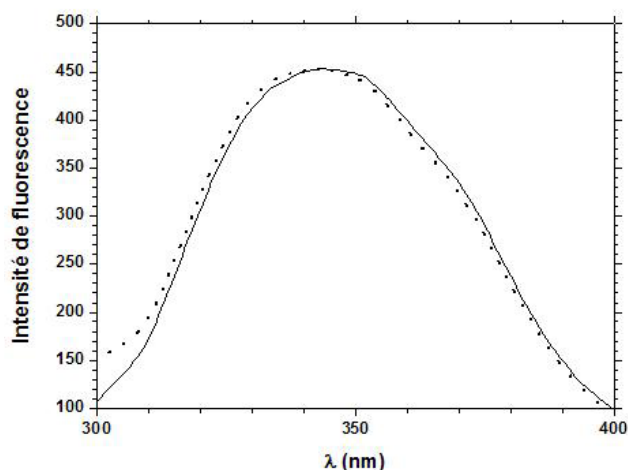


Figure V.23 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR apo à $3,6\mu\text{M}$ enregistrés dans du tampon MOPS 20mM pH7 KCl 150mM à 25°C après excitation à 295 nm et 20 min d'équilibration (—), et dans du tampon 20mM MOPS pH7 40mM KCl à 25°C après excitation à 295 nm et 20 min d'équilibration (···).

V.6.2.2. Fluorescence d'HpFUR métallée

L'effet des métaux sur la fluorescence du tryptophane a ensuite été observé (Figure V.24). Les spectres ont été enregistrés sur HpFUR apo à l'équilibre et en présence de différents équivalents de métal ajoutés progressivement dans l'échantillon.

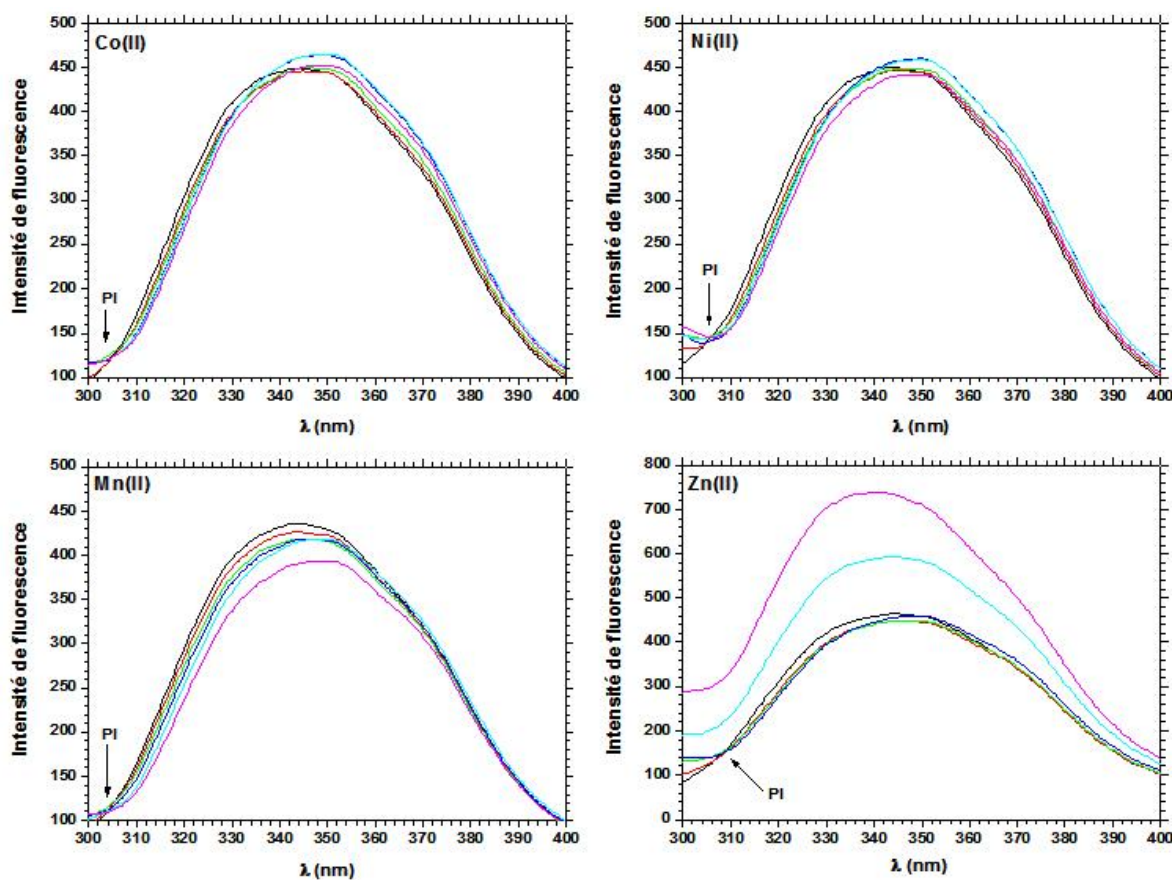


Figure V.24 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR apo (—) à $3,6\mu\text{M}$ et avec 0,5eq (—), 0,8eq (—), 1,7eq (—), 4,2 (—) et 12,5eq (—) de métal ajoutés. Spectres enregistrés après équilibration puis

excitation à 295 nm. Conditions : 20mM MOPS pH7 150mM KCl à 25°C. PI : point isobestique. Des spectres similaires ont été enregistrés pour HpFUR métallée au Co(II) dans du tampon 20mM MOPS pH7 40 mM KCl. (Sels métalliques : NiCl₂, MnCl₂, CoSO₄ et ZnSO₄).

Les spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR métallée par du Co(II) et du Ni(II) sont fortement similaires avec l'existence d'un point isobestique (PI) à 305nm. Par contre les spectres obtenus après métallation d'HpFUR par du Mn(II) ou du Zn(II) diffèrent et les points isobestiques sont alors situés à 303 et 309 nm respectivement. Une transition entre deux états d'HpFUR (apo-métallée) a bien eu lieu avec ces 4 métaux.

Le λ_{\max} d'émission de fluorescence du tryptophane varie de 344 nm à 349.5 nm lors de l'addition des métaux. Une représentation de l'évolution de ce λ_{\max} en fonction du nombre d'équivalents de métal ajoutés a été réalisée pour mieux visualiser sa variation (Figure V.25).

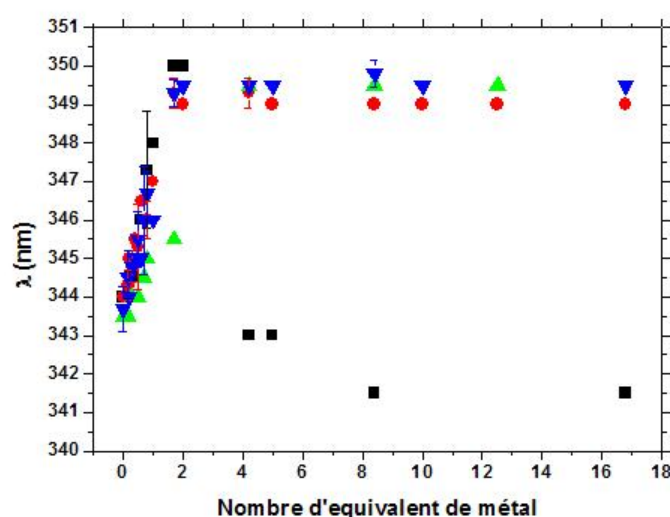


Figure V.25 Evolution de la λ_{\max} d'émission de fluorescence du tryptophane d'HpFUR en fonction du métal (Zn(II) : ■ ; Ni(II) : ● ; Mn(II) : ▲ ; Co(II) : ▼) et du nombre d'équivalent ajouté par sous unité monomérique de protéine.

Ce déplacement progressif du λ_{\max} d'émission est observé pour le Co(II), le Ni(II) et le Zn(II) entre 0 et 2 équivalents. Pour le Mn(II), ce déplacement maximum est observé à partir de 4 équivalents. L'affinité de la protéine pour le Mn(II) par rapport à celle pour le Co(II) ou le Ni(II) pourrait expliquer cette différence de variation.

Ce λ_{\max} d'émission reste ensuite de 349.5 nm pour le Co(II), le Ni(II) et le Mn(II) pour des additions métalliques plus importantes. Ce déplacement rend compte du changement d'environnement du tryptophane qui tend à être totalement exposé au solvant. L'addition du métal a induit un changement conformationnel de la protéine rendant plus accessible le tryptophane au solvant. Ce résidu est situé à l'extrémité du dernier brin β dans le domaine C-ter.

En supposant que ces changements soient corrélés à la métallation du second site 2, cela signifierait que l'affinité de celui-ci soit plus grande pour le Co(II), le Ni(II) et le Zn(II) que pour le Mn(II).

Le λ_{\max} d'HpFUR métallée au Co(II), dont la métallation dans le site 2 exclusivement a été suivie par spectroscopie d'absorption UV-Vis, est de 349,5 nm (Figure V.26).

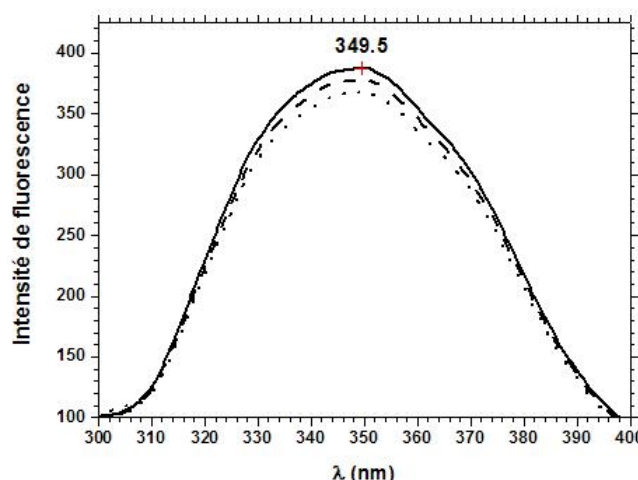


Figure V.26 Spectres d'émission de fluorescence du tryptophane d'Holo-HpFUR à 2,9 μ M (métallée dans le site 2 par 1,5 eq de Co(II) –suivi UV-Vis) (—), avec 5 eq de Co(II) (---), avec 15 eq de Co(II) (----), pour ces deux additions aucun suivi UV-Vis n'a été fait. Spectres enregistrés après équilibration puis excitation à 295 nm. Conditions : 20mM MOPS pH7 150mM KCl à 25°C.

Le déplacement de 344 à 349,5 nm résulte donc bien de la métallation du site 2 qui est potentiellement le site de régulation.

L'addition de métal supplémentaire ne modifie pas le λ_{\max} mais son intensité est légèrement quenchée. Ce quench pourrait être le reflet de la métallation du site à Zn(II) par du Co(II).

Pour le Zn(II), un second déplacement du λ_{\max} de 349,5 à 341,5 nm est observé après 2 équivalents de métal ajoutés par monomère. Cette variation traduit un nouveau changement d'environnement du tryptophane qui est de nouveau moins exposé au solvant. Il est plus enfoui qu'à l'état initial (protéine apo). Il pourrait refléter un changement conformationnel de la protéine associé éventuellement à une oligomérisation de cette dernière.

Un troisième point est notable lors de cette étude, l'évolution de l'intensité de fluorescence du tryptophane n'est pas la même selon les métaux.

Pour le Co(II) et le Ni(II), l'intensité est identique jusqu'à 0,8 eq de métal ajouté par monomère, après quoi cette dernière croît légèrement jusqu'à 1,7-2 eq de métal ajoutés pour

ensuite diminuer (quench de la fluorescence). Pour le Mn(II), un quench constant de la fluorescence est observé. Pour le Zn(II), jusqu'à 1,7 eq l'intensité de fluorescence évolue de la même façon que pour le Ni(II) et le Co(II). Au delà de 2 équivalents de Zn(II), l'intensité est fortement augmentée.

La variation d'intensité de fluorescence du tryptophane est fonction de l'environnement du résidu. Certaines chaînes latérales de résidus (Lys, Tyr, Gln, Glu, Asn, Asp, His, Cys) sont susceptibles de « quencher » plus ou moins fortement la fluorescence du tryptophane (Chen & Barkley, 1998). Les mécanismes impliqués (transfert de protons ou d'électrons à l'état excité) imposent une proximité spatiale. Il en est de même pour les métaux de transition qui peuvent quencher la fluorescence du tryptophane (cf. chapitre III).

Les variations de la fluorescence du tryptophane observées lors de l'addition des métaux, qui sont liées au déplacement du λ_{\max} , peuvent être expliquées, entre autres, par un quench « reverse » de la fluorescence par les chaînes latérales de certains résidus. En effet l'unique tryptophane (W141) d'HpFUR est à proximité de résidus quenchers (C142, K143, E144 et C145). La métallation du site 2 engendre un changement de conformation de la protéine rendant le tryptophane plus accessible au solvant, le quench par ces résidus en est éventuellement affecté. Ceci expliquerait la faible augmentation (Ni(II) / Co(II) / Zn(II)) ou diminution (Mn(II)) d'intensité lorsque la variation du λ_{\max} est totale. Le métal en excès pourrait par la suite aller se substituer au Zn(II) du site 1 qui comprend au minimum 1 cystéine. Cette substitution pourrait engendrer un nouveau quench de la fluorescence dû soit aux résidus soit au métal (*via* du « FRET »). Ce quench implique une proximité spatiale (dizaine d'Å). Ceci signifierait que le tryptophane soit dans l'environnement proche du site à zinc (le tryptophane se trouve juste en amont d'un motif CX₂C).

Cette étude montre que les quatre métaux sont capables de métaller le site 2 ce qui induit un changement de l'environnement du tryptophane. La conformation de la protéine évolue donc. Cependant le point isobestique obtenu lors des métallations par le Ni(II) et le Co(II) diffère de ceux obtenus lors des métallations par Mn(II) ou par le Zn(II). La protéine métallée ne doit pas être totalement identique.

V.7. La liaison à l'ADN : région intergénique *nikR-exbB*

D'après la littérature, HpFUR est capable de lier l'ADN en absence de métal ajouté au système et en présence de métal en fonction de la séquence opératrice à lier. La métallation du second site d'HpFUR (par analogie à EcFUR), d'après la littérature, ne serait donc pas essentielle pour observer la liaison de cette dernière sous sa forme « apo » à certaines séquences d'ADN.

En 2005, il a été montré par la technique des empreintes à la DNase I qu'HpFUR en présence de 100µM de Ni(II) ou de Mn(II) était capable de lier deux motifs de la région intergénique *nikR-exbB* qui nous intéresse (Delany *et al.*, 2005) (Figure V.27).

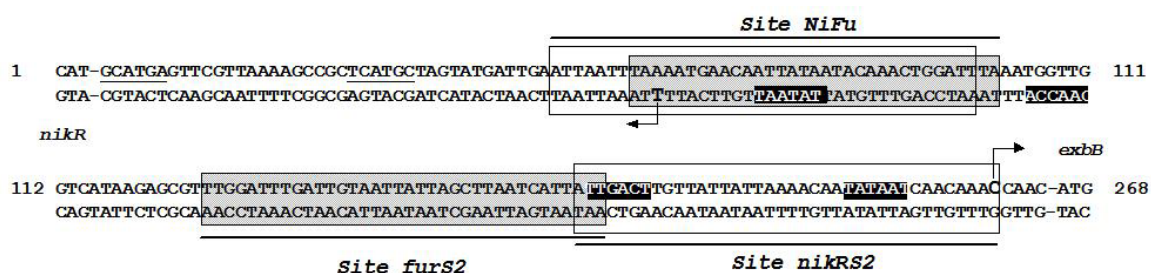


Figure V.27 Liaison d'HpNikR et HpFUR sur la région intergénique au niveau des promoteurs de *pnikR* et *pexbB* (schéma inspiré de (Delany *et al.*, 2005)). Le +1 de transcription est indiqué par une flèche. Les boîtes -35 et -10 sont surlignées en noir. Les zones protégées par HpNikR sont délimitées par le cadre ouvert. Les zones protégées par HpFUR sont délimitées par le cadre grisé. Le site *NiFu* est lié par HpNikR et HpFUR, le site *furS2* et le site *nikRS2* sont liés respectivement par HpFUR et HpNikR. Les zones protégées par HpFUR ou par HpNikR ont été déterminées par des empreintes à la DNase I faites sur un seul brin d'ADN. La zone de protection sur le second brin a donc été extrapolée.

Le premier motif nommé *NiFu* recouvre le promoteur *pnikR* et peut être protégé soit par HpNikR, soit par HpFUR d'après Delany *et al.*. Le second motif nommé *furS2* recouvre en partie la boîte -35 du promoteur *pexbB* et serait exclusivement protégé par HpFUR.

Dernièrement, il a été proposé que l'expression transcriptionnelle des gènes de l'opéron *exbB* serait indépendante d'HpFUR et du fer (Ernst *et al.*, 2006). Ce résultat semble en contradiction avec le fait qu'HpFUR puisse lier un motif qui chevauche en partie le promoteur ainsi qu'avec les données de transcriptome couplées à l'analyse du régulon HpFUR qui montrent une répression de la transcription de cet opéron par HpFUR (Danielli *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2005a). Récemment, il a été montré que le système énergétique ExbB/ExbD/TonB codé par les gènes *hp1339-1340* et *1341* était impliqué dans l'importation du fer et du nickel selon un mécanisme pH-dépendant (Schauer *et al.*, 2007). Il a par ailleurs été montré que l'expression protéique de ExbB/ExbD/TonB était dépendante de la concentration en nickel mais aussi, dans une moindre mesure, de la concentration en fer.

Le contrôle de l'expression transcriptionnelle par les métallorégulateurs et plus particulièrement par HpFUR de cette région ne semble pas évident et peut être conditions dépendantes ([Ni], [Fe], [Sels], [pH], [HpFUR]*in vivo*, [HpNikR]*in vivo*...).

Nous nous sommes donc intéressés à la liaison d'HpFUR sur les sites *furS2* et *NiFu* et nous avons choisi de caractériser, dans un premier temps, la liaison sur la séquence *furS2*.

Cette étude a été faite par Sylvia Vitale, en utilisant la technique de la protection à la nucléase dont le principe a été présenté en Matériel et Méthodes. Le plasmide utilisé est le pHP2S (cf. chapitre IV), il contient la totalité de la séquence intergénique. Le site *furS2* contient un site de coupure pour l'enzyme *HinfI*.

V.7.1. Liaison d'HpFUR apo

Afin de mesurer la liaison ou non d'HpFUR sur ces motifs dans le pHP2S en absence de métal, différentes conditions expérimentales ont été testées. Les tests ont été majoritairement réalisés pour la mesure de la liaison sur *furS2*.

Si HpFUR ne se lie pas, le profil de digestion par *HinfI* comprendra les bandes :

1547, 517, 403, 396, 75 et 65 pb

Si HpFUR se lie sur *furS2*, le profil de digestion par *HinfI* comprendra les bandes :

1950, 517, 396, 75 et 65 pb

La liaison d'HpFUR sur le site *nikRS2* a également été testée afin de s'assurer de la spécificité de liaison d'HpFUR sur son motif.

Si HpFUR ne se lie pas ou ne polymérise pas sur le motif *nikRS2*, le profil de digestion par *SspI* comprendra les bandes : 2216 et 787 pb.

Si HpFUR se lie ou polymérise sur le motif *nikRS2*, le profil de digestion par *SspI* comprendra une bande à 3003 pb qui correspond au plasmide linéaire.

Les conditions qui ont été retenues pour observer des profils de digestion nets nécessitent un traitement à la trypsine de l'ADN mis en pris en présence d'HpFUR à la suite de la digestion par la nucléase (Figure V.28). En effet en absence de traitement à la trypsine, le profil de migration de l'ADN mis en présence d'HpFUR n'était pas net. Des « smears » notables qui pouvaient résulter de la liaison d'HpFUR à l'ADN, perturbaient l'interprétation des profils de digestion.

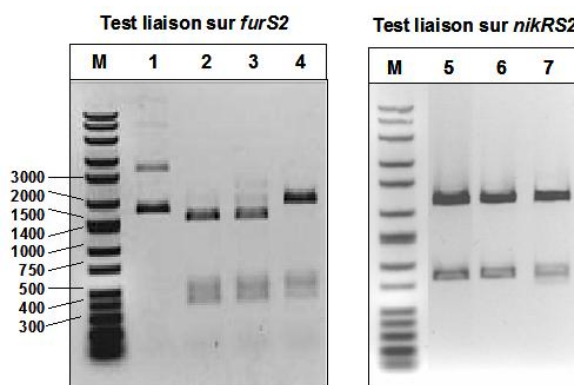


Figure V.28 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site *furS2* et *nikRS2* mesurée par un test de protection à la coupure par *HinfI* et *SspI*. 20nM de plasmide pHP2S sont incubés ou non avec 5μM d'HpFUR métallée ou non dans du BisTrisPropane 100mM pH 7.5 KCl 100mM MgSO₄ 5mM. Le produit de digestion est soumis à une digestion par une protéinase « Trypsine » pendant 2H à 37°C. 1 : Plasmide non digéré 20nM ; 2 : Plasmide digéré par *HinfI* ; 3 : Plasmide digéré après une incubation avec 5μM d'HpFUR apo ; 4 : Plasmide digéré après une incubation avec 5μM d'HpFUR métallée au préalable avec 50μM de Mn(II) ; 5 : Plasmide digéré par *SspI* ; 6 : Plasmide digéré après une incubation avec 5μM d'HpFUR apo ; 7 : Plasmide digéré après une incubation avec 5μM d'HpFUR métallée au préalable avec 10μM de Co(II).

En absence de métal, HpFUR ne se lie pas à *furS2*, le profil de digestion est similaire à celui observé en absence de protéine. Par contre, en présence de Mn(II), HpFUR se lie totalement à *furS2* (puits 4) et protège de la coupure par *HinfI*. La liaison d'HpFUR à *furS2* est bien dépendante du métal (Mn(II) ou Co(II) cf. ci après). La spécificité de liaison d'HpFUR sur *furS2* a été contrôlée en mesurant sa liaison ou non sur le site proximal d'HpNikR *nikRS2*. HpFUR ne s'y lie pas en absence (puits 6) ni même en présence de métal (puits 7) (Figure V.28). HpFUR ne protège pas le site de coupure de *SspI*.

V.7.2. Liaison d'HpFUR en présence de différents métaux.

La liaison d'HpFUR à *furS2* en présence de métal, a été mesurée dans deux conditions :

- Soit HpFUR diluée à 5μM était métallée avec différents équivalents de sels métalliques (NiCl₂, MnCl₂, CoSO₄, ZnSO₄) (condition 1). Le facteur limitant pour observer la liaison à l'ADN est la métallation de la protéine et donc l'affinité du site 2 pour le métal.
- Soit HpFUR concentrée à 320μM métallée avec 1 équivalent de sel métallique (condition 2) était ensuite diluée. Le facteur limitant pour observer la liaison à l'ADN est l'affinité de la protéine 100% métallée pour l'ADN.

V.7.2.1. Liaison à l'ADN mesurée avec la condition 1 de métallation

HpFUR se lie bien à *furS2* en présence de Co(II) (Figure V.29). La présence d'un large excès de Co(II) (10 à 40eq) n'induit pas une liaison aspécifique de la protéine à l'ADN puisque le profil de digestion est inchangé.

2,5 μM de Co(II) suffisent pour observer 50% de protection. Une liaison de 100% est observée pour 5 μM de Co(II) ajoutés à une protéine de 5 μM .

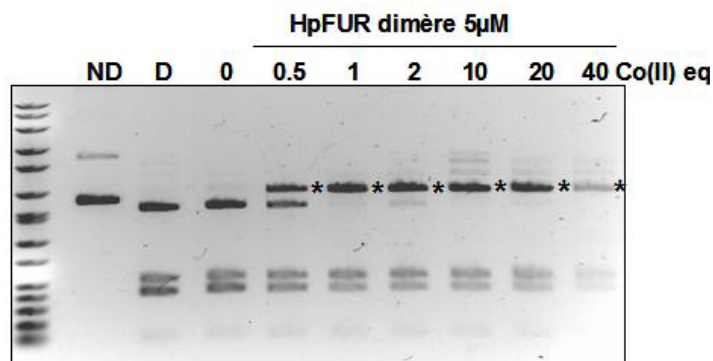


Figure V.29 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site *furS2* mesurée par un test de protection à la coupure par *HinfI*. 10nM de plasmide pHP2S sont incubés, dans du BisTrisPropane 100mM pH 7.5 KCl 100mM MgSO_4 5mM, avec 5 μM d'HpFUR métallée au préalable avec différents équivalent de Co(II) . Le produit de digestion est soumis à une digestion par la « Trypsine » pendant 2H à 37°C. (ND : plasmide non digéré ; * bande caractéristique de la liaison spécifique sur *furS2*). Sel métallique : CoSO_4 .

En présence de Ni(II) , HpFUR se lie également sur *furS2* même en présence d'un large excès

(
Figure V.30).

2,5 μM de Ni(II) ne permettent pas d'activer HpFUR, le site 2 doit présenter une affinité moins bonne pour le Ni(II) que pour le Co(II) . A 5 μM en Ni(II) , l'activation d'HpFUR débute avec ~10% de liaison. A 10 μM en Ni(II) , l'activation est presque totale avec ~90% de protection de *furS2*.

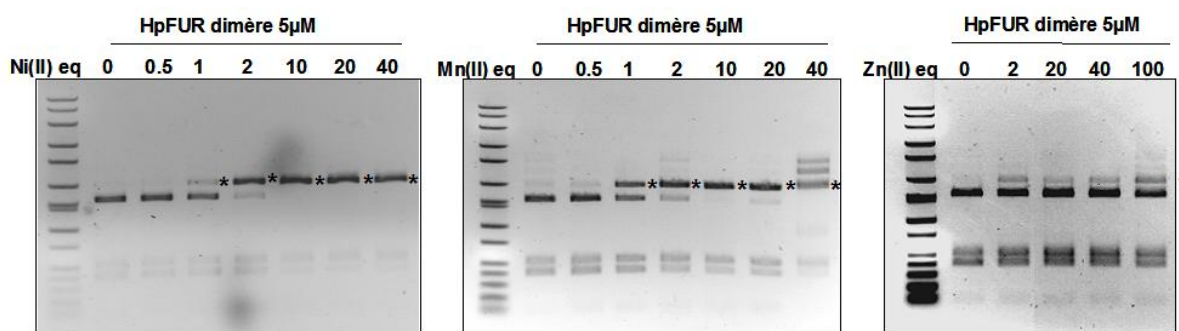


Figure V.30 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site *furS2* mesurée par un test de protection à la coupure par *HinfI*. 10nM de plasmide pHP2S sont incubés, dans du BisTrisPropane 100mM pH 7.5 KCl 100mM MgSO_4 5mM, avec 5 μM d'HpFUR métallée au préalable avec différents équivalents de Ni(II) , Mn(II) et Zn(II) . Le produit de digestion est soumis à une digestion par la « Trypsine » pendant 2H à 37°C. (ND : plasmide non digéré ; * bande caractéristique de la liaison spécifique sur *furS2*). Sels métalliques : NiCl_2 , MnCl_2 , ZnSO_4 .

En présence de Mn(II) , HpFUR se lie également sur *furS2* mais au-delà de 20 équivalents le profil de digestion diffère. Cette variation peut être expliquée soit par une liaison aspécifique de la protéine à l'ADN (agrégation) soit par une inhibition de *HinfI* par le Mn(II) à plus de 100 μM .

Une telle inhibition a d'ailleurs déjà été décrite lors d'études similaires faites sur EcFUR.

A 5 μ M en Mn(II), HpFUR activée protège ~50% de *furS2*. A 10 μ M, l'activation est presque totale avec ~90% de protection de *furS2*.

En présence de Zn(II), HpFUR se lie partiellement sur *furS2* (10%) quelque soit la quantité de Zn(II) ajoutée à la protéine. Le Zn(II) ne permet pas une activation évidente de la protéine pour qu'elle puisse se lier à HpFUR.

Le Co(II), le Ni(II) et le Mn(II) sont capables d'activer HpFUR. L'affinité du site 2 pour les métaux semble être organisée de la façon suivante : Co(II) > Mn(II) > Ni(II) >>>> Zn(II). Cette dernière serait de l'ordre du micromolaire comme cela avait été estimé lors des mesures en dichroïsme circulaire.

V.7.2.2. *Liaison à l'ADN mesurée avec la condition 2 de métallation*

Dans cette condition de métallation, 320 μ M de protéine ont été métallés par 1 équivalent de Co(II), de Ni(II), de Mn(II) ou de Zn(II). La protéine métallée a ensuite été diluée et mise en présence des 10nM de plasmide.

La liaison d'HpFUR métallée uniquement dans le site 2 sur *furS2* a été mesurée afin d'apprécier la quantité minimale de protéine nécessaire pour observer cette liaison (Figure V.31).

1 μ M d'HpFUR métallée avec 1 équivalent de Co(II), Mn(II) et Ni(II) est suffisant pour observer 100% de liaison du site *furS2*.

La métallation du site 2 est suffisante pour activer la protéine. Pour des concentrations de 5 et 10 μ M d'HpFUR en présence de 1 équivalent de Mn(II) le profil de digestion est différent des profils de liaison spécifique. MnHpFUR pourrait se lier de façon aspécifique à l'ADN (agrégation).

Le $K_{d\text{apparent}}$ de liaison d'HpFUR métallée sur *furS2* est compris entre 100nM et 1 μ M.

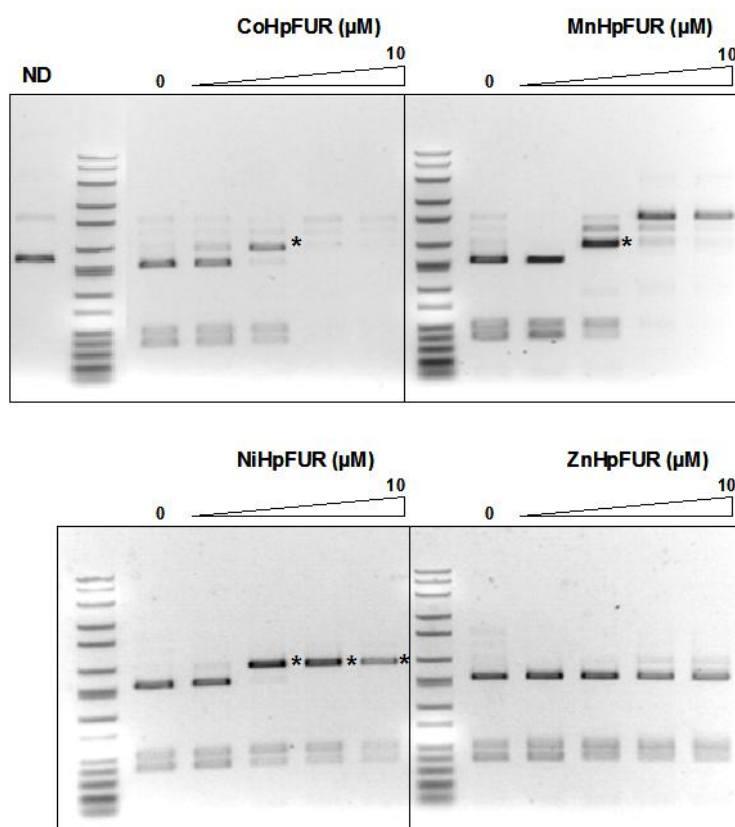


Figure V.31 Liaison à l'ADN d'HpFUR dimérique sur le site *furS2* mesurée par un test de protection à la coupure par *HinfI*. 10nM de plasmide pHP2S sont incubés, dans du BisTrisPropane 100mM pH 7.5 KCl 100mM MgSO₄ 5mM, avec 0, 0.1, 1, 5 et 10μM d'HpFUR métallée au préalable avec 1 équivalent de Co(II), Mn(II), Ni(II) ou Zn(II). Le produit de digestion est soumis à une digestion par la « Trypsine » pendant 2H à 37°C. (ND : plasmide non digéré ; * bande caractéristique de la liaison spécifique sur *furS2*)

En présence de Zn(II), 10μM ZnHpFUR doivent être ajoutés pour commencer à noter une liaison à l'ADN. Le Zn(II) présent dans le site 2 ne permet définitivement pas la liaison à l'ADN spécifique comme aspécifique.

HpFUR peut être activée par différents métaux contenus dans le site 2 (Ni(II), Co(II) ou Mn(II)) pour se lier sur la séquence *furS2*. Cette liaison est spécifique et ne semble pas accompagnée d'une polymérisation de la protéine sur l'ADN. En effet HpFUR ne protège pas le site de coupure *SspI* introduit dans la séquence *nikRS2*.

L'étude de la liaison d'HpFUR sur le motif *NiFu* n'a pas encore été mesurée par le test nucléase. Cependant des premiers tests préliminaires en EMSA ont montré qu'HpFUR pouvait se lier à cette séquence spécifiquement de façon métal dépendante (Ni(II) ou Mn(II), Co(II) non testé).

Le test nucléase pour étudier la liaison individuelle d'HpFUR sur la région intergénique est opérationnel.

V.8. Bilan de la caractérisation

HpFUR est une protéine de la famille des métallorégulateurs FUR qui partage 34% d'identité et 56% de similitude avec FUR d'*E.coli*. Nativement cette protéine est un dimère qui présente une structure secondaire riche en hélices α . Elle comprend 1 équivalent de zinc par sous unité monomérique. Ce métal tendrait à jouer un rôle important dans le processus de dimérisation. Ce site 1, par analogie à EcFUR pourrait être qualifié de site structural. HpFUR présente également un second site de métallation qui par analogie à EcFUR pourrait être qualifié de site de régulation. Ce site qui est penta ou hexacoordonné, ne comprend pas de cystéine dans sa sphère de coordination et lie 1 équivalent de Co(II) par monomère. L'ajout d'un excès de Co(II) sur la protéine concentrée tend à induire une substitution de métal. Le cobalt se substituerait progressivement au zinc contenu dans le site 1 comme cela a pu être observé pour FUR d'*E.coli* (Adrait *et al.*, 1999). Un dosage du contenu métallique dans ces conditions confirmerait pleinement cet aspect. Ce site serait tétracoordonné et comprendrait au minimum un résidu cystéine dans la sphère de coordination. La saturation de ce site n'a pas été atteinte ; en considérant le rapport de l'épsilon apparent à 742nm par rapport à l'épsilon théorique d'une bande d-d d'un site tétracoordonné (Rapport : 3.4), on peut penser qu'un tel coefficient est également applicable à l'épsilon mesuré à 308nm. L'épsilon ne serait plus de 1195 M⁻¹.cm⁻¹ mais d'environ 4000 M⁻¹.cm⁻¹. Une telle valeur d'épsilon nous amène à penser que ce site impliquerait quatre cystéines dans sa sphère de coordination. Des mesures en EXAFS ainsi que des modifications chimiques avec de l'iodoacétamide analysées en spectrométrie de masse nous permettraient de confirmer ou de réfuter cette hypothèse. L'affinité du site 2 pour le métal est moins élevée que celle pour le site 1 et serait de l'ordre du micromolaire.

L'addition de métal (Co, Ni, Mn, Zn) induit des changements structuraux sur HpFUR comme l'ont montré les études en dichroïsme circulaire et en fluorescence du tryptophane. Ces changements sont directement liés à la métallation du site 2.

En dichroïsme circulaire, il a été noté que la protéine conserverait une structuration marquée en hélice α . Cette dernière, toutefois, fluctue légèrement en fonction des métaux utilisés. Le Ni(II) et le Co(II) tendent à engendrer les mêmes changements de la structure secondaire à la différence du Mn(II) et du Zn(II).

Lors du suivi de fluorescence il a été noté que la liaison du Ni(II), du Co(II), du Mn(II) et du Zn(II) dans le site 2 rendait plus accessible le tryptophane au solvant. Au-delà de la métallation du site 2, l'effet d'un métal supplémentaire sur la protéine est métal dépendant.

L'excès de Zn(II) tendrait à rendre le tryptophane moins accessible au solvant. La protéine pourrait éventuellement s'agréger et former des oligomères. A la différence des excès de Ni(II), de Co(II) et de Mn(II) qui ne modifient pas l'environnement du tryptophane mais qui au contraire en diminuent l'intensité de fluorescence. Ces métaux pourraient se substituer au Zn(II) du site 1.

Une similitude dans le mécanisme d'activation d'HpFUR par le métal avec celui d'EcFUR semble exister. En effet, d'après le mécanisme d'activation proposé pour EcFUR, des interactions ioniques auraient lieu, entre autres, entre le domaine C-ter et l'extrémité du domaine N-ter lorsque la protéine est APO ; ces interactions n'auraient plus lieu après la liaison du métal dans le site de régulation en raison d'un repliement de l'extrémité N-ter en hélice α . Ce comportement caractériserait un éloignement entre les deux domaines et donc potentiellement une plus grande accessibilité au solvant. Or la métallation du site 2 d'HpFUR tend à rendre le tryptophane plus accessible au solvant et ce dernier est situé dans l'extrémité du domaine C-terminal (W141). Des mouvements similaires de ces deux extrémités N et C-ter pourraient donc être envisagés pour HpFUR. Il serait intéressant de connaître l'état de structuration de l'extrémité N-ter d'HpFUR apo (présence ou non de l'hélice α 1).

Bien qu'HpFUR soit capable de lier le Co(II), le Ni(II), le Mn(II) et le Zn(II) dans le site 2, ces derniers ne sont pas tous capables d'activer HpFUR. HpFUR ne peut pas se lier à *furS2* en présence de Zn(II). Le site 2 ne doit pas présenter la même géométrie selon les métaux. La structuration même de la protéine doit différer selon le métal (cf. CD) en dépit du fait que tous soient en mesure de rendre plus accessible le tryptophane au solvant.

Le zinc est généralement lié dans des sites de géométrie tétraédrique. La protéine métallée par du zinc ne doit pas présenter la bonne conformation pour qu'HpFUR puisse se lier dans les conditions étudiées. La protéine métallée par du Ni(II), du Co(II) ou du Mn(II) doit adopter une conformation favorable à la liaison d'HpFUR sur *furS2*. La protéine apo ne doit pas non plus adopter une conformation idéale pour qu'HpFUR apo puisse se lier à *furS2*. Il serait intéressant de résoudre les structures cristallographiques d'HpFUR apo et métallée au Zn(II), et au Mn(II). Des premiers essais de cristallisation d'HpFUR apo ont été initiés avec L. Terradot et U. Kapp, mais n'ont pas été concluants.

Par ailleurs, HpFUR apo ou métallée ne protège pas le site de coupure inséré dans *nikRS2*. HpFUR ne tendrait donc pas à polymériser sur des séquences proches. Ceci en accord avec les données de l'équipe de V. Scarlato (Delany *et al.*, 2005).

L'étude de la liaison d'HpFUR sur le site *NiFu* va être initiée sur le test nucléase en vue d'étudier des compétitions éventuelles entre HpNikR et HpFUR. Cependant, nous savons d'après une étude préliminaire en EMSA, qu'HpFUR se lie sur *NiFu* en présence de Ni(II) ou de Mn(II). L'étude de la liaison individuelle d'HpFUR à l'ADN (*NiFu* et *furS2*) doit encore être complétée par des mesures en anisotropie de fluorescence et d'EMSA pour déterminer les stoechiométries de liaison et les constantes de dissociation.

Bien qu'une liaison d'HpFUR sur le site *pnikR* (séquence notée *NiFu*) ait été identifiée par des mesures de footprint (Delany *et al.*, 2005) ou par EMSA (nos données), il n'a jamais été rapporté lors des études transcriptomiques qu'HpFUR contrôlait l'expression d'HpNikR. L'action d'HpFUR serait alors secondaire à l'action d'HpNikR. *A priori*, vu le positionnement de la séquence opératrice d'HpFUR, cette dernière serait impliquée dans un processus de répression comme HpNikR. Par ailleurs celle-ci réprime l'expression d'HpFUR de façon Ni-dépendante.

Si HpFUR est capable d'assurer *in vivo* une régulation de l'expression d'HpNikR, alors celle-ci doit avoir lieu dans des conditions particulières qui n'ont pas été testées lors des études transcriptomiques.

Concernant la liaison d'HpFUR en amont de *pexbB* (séquence notée *furS2*), de nombreux résultats contradictoires existent. Les données de transcriptome laissent clairement apparaître qu'HpFUR réprimerait de façon modérée la transcription des gènes *exbB/exbD/TonB* (Ernst *et al.*, 2005a). Delany *et al.*, ont déterminé la séquence protégée par HpFUR et noté le fait que l'expression du promoteur *pexbB* était déreprimée dans une souche Δ HpFUR (Delany *et al.*, 2005). Ce système énergétique serait nécessaire pour l'importation du fer à pH neutre (Schauer *et al.*, 2007). Cependant il n'est pas unique. Il existe chez *H. pylori* d'autres systèmes énergétiques codés par des protéines homologues à ExbB/ExbD/TonB (hp1339/1340/1341) qui sont hp1445/1446, hp1130/1129 et hp0582. Ces systèmes pourraient être aussi contrôlés par HpFUR (comme hp1445 (Danielli *et al.*, 2006)).

De façon surprenante, il a été montré dernièrement que l'expression de cet opéron (*hp1339/1340/1341*) ne dépendait ni d'HpFUR ni du fer (Ernst *et al.*, 2006). Comment une telle différence pourrait être expliquée ? Il est fort probable que l'action d'HpFUR soit dépendante de nombreux paramètres parmi lesquels la nature du métal, sa concentration, la concentration en protéine, le pH, mais également son affinité relative pour sa séquence opératrice. Nous espérons d'ailleurs pouvoir aider à la compréhension de ces régulations avec le test nucléase.

Cette séquence *furS2* se trouve en amont du promoteur *pexbB* et plus précisément de façon proximal du motif -35. Un tel positionnement d'une séquence opératrice d'HpFUR a déjà été observé dans le cas de sa propre régulation. En effet HpFUR peut lier trois sites (OI, OII, OIII) au niveau de son promoteur en fonction du contenu métallique et de la concentration en protéine (Delany *et al.*, 2003). Le site d'intérêt, OI (-34 à -66 par rapport au TSP), serait lié par HpFUR soit métallée soit apo. Ce site pourrait servir d'« UP élément » qui faciliterait la transcription et servirait également de site de haute affinité pour HpFUR. Cette dernière en s'y liant limiterait la transcription en empêchant des interactions entre la sous-unité α_C de l'ARN polymérase et l'ADN. Cette séquence est particulièrement riche en base AT (85%). Le site *furS2* pourrait éventuellement jouer une telle fonction, bien que la séquence soit assez différente de celle du site OI et de la séquence consensus des UP éléments (Figure V.32).

Séquence consensus	-59 nnAAA (A/T) (A/T) T (A/T) TTTTnnAAAAnnn -38
UP élément	
Séquence du site OI	-66 TGATTAAATTAAAATAATAATGAGTTTTATCT -34
Séquence du site <i>furS2</i>	-70 TTGGATTGATTGTAATTATTAGCTTAATCATTATT -35

Figure V.32 Séquence consensus des UP éléments (Estrem *et al.*, 1998) comparée aux séquences du site OI (Delany *et al.*, 2003) et du site *furS2* (Delany *et al.*, 2005) liées par HpFUR.

En effet *furS2* se situe en -35 -70 par rapport au TSP et comprend 80% de base AT. HpFUR en se liant sur cette séquence pourrait limiter le bon positionnement de l'ARN polymérase et perturber les interactions de celle-ci avec *furS2*. Cette répression ne serait pas exclusive dans la mesure où elle serait dépendante de la concentration en HpFUR et de la concentration en fer et/ou en nickel (compétition entre l'enzyme et la protéine). Or il a été montré que la concentration en HpFUR variait en fonction de la phase de croissance de la bactérie (accumulation) à la différence de la concentration en HpNikR (Danielli *et al.*, 2006). Il serait d'ailleurs intéressant d'en déterminer les concentrations relatives.

Cette fluctuation de concentration en protéine pourrait expliquer les différents résultats entre les études de transcriptomique et les autres études. Le caractère répressif d'HpFUR métallée sur *furS2* serait faible ($Kd_{furS2} \sim 0,1$ et $1\mu M$) en comparaison à celui de HpNikR ($Kd_{nikRS2} : 24nM$ en conditions NiMn) qui se positionne directement sur le promoteur.

Il pourrait être intéressant d'étudier la liaison de l'ARN polymérase sur le promoteur *pexbB* et d'observer l'évolution du taux de transcription du gène *exbB* en fonction de la présence de ce site *furS2* ou non ou d'un site modifié. Nous pourrions ainsi savoir si ce site *furS2* est un potentiel « UP élément ».

V.9. Références

- Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1999). Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 6248-6260.
- Alamuri, P., Mehta, N., Burk, A. & Maier, R. J. (2006). Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S cluster synthesis protein NifS by iron, oxidative stress conditions, and fur. *J Bacteriol* 188, 5325-5330.
- Bereswill, S., Lichte, F., Vey, T., Fassbinder, F. & Kist, M. (1998). Cloning and characterization of the fur gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 159, 193-200.
- Bereswill, S., Lichte, F., Greiner, S., Waidner, B., Fassbinder, F. & Kist, M. (1999). The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* 188, 31-40.
- Bereswill, S., Greiner, S., van Vliet, A. H., Waidner, B., Fassbinder, F., Schiltz, E., Kusters, J. G. & Kist, M. (2000). Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 182, 5948-5953.
- Braun, V., Schäffer, S., Hantke, K. & Tröger, W. (1990). Regulation of Gene Expression by Iron. In *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism Colloquium Mosbach 1990*, pp. 165-179. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Chen, Y. & Barkley, M. D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 37, 9976-9982.
- Danielli, A., Roncarati, D., Delany, I., Chiarini, V., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2006). In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J Bacteriol* 188, 4654-4662.
- D'Autreaux, B., Pecqueur, L., de Peredo, A. G., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E. & Michaud-Soret, I. (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* 46, 1329-1342.
- Delany, I., Pacheco, A. B., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2001a). Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J Bacteriol* 183, 4932-4937.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2001b). The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 42, 1297-1309.
- Delany, I., Spohn, G., Pacheco, A. B., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2002). Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol Microbiol* 46, 1107-1122.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2003). An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 50, 1329-1338.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2005). In vitro analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187, 7703-7715.
- Ernst, F. D., Bereswill, S., Waidner, B. & other authors (2005a). Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology* 151, 533-546.
- Ernst, F. D., Homuth, G., Stoof, J. & other authors (2005b). Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol* 187, 3687-3692.

- Ernst, F. D., Stoof, J., Horrevoets, W. M., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2006). NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun* 74, 6821-6828.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W. & Gourse, R. L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9761-9766.
- Fassbinder, F., van Vliet, A. H., Gimmel, V., Kusters, J. G., Kist, M. & Bereswill, S. (2000). Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified fur titration assay (FURTA-Hp). *FEMS Microbiol Lett* 184, 225-229.
- Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W. & Pohl, E. (2007). Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 282, 9914-9922.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4620-4625.
- Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. & Bersch, B. (2006). Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 281, 21286-21295.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47, 903-915.
- Reshetnyak, Y. K., Koshevnik, Y. & Burstein, E. A. (2001). Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys J* 81, 1735-1758.
- Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A. & de Reuse, H. (2007). Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* 63, 1054-1068.
- Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (2005). Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* 579, 5454-5460.
- Traore, D. A., El Ghazouani, A., Ilango, S., Dupuy, J., Jacquamet, L., Ferrer, J. L., Caux-Thang, C., Duarte, V. & Latour, J. M. (2006). Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 61, 1211-1219.
- van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Stoof, J., Poppelaars, S. W. & Kusters, J. G. (2004). Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect Immun* 72, 766-773.
- Wang, G., Alamuri, P. & Maier, R. J. (2006). The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 61, 847-860.

Chapitre VI

Conclusion Générale

L'objectif premier de ce travail de thèse était de comprendre les mécanismes mis en jeu pour expliquer la sélectivité ionique d'une protéine métallorégulatrice présente chez *Escherichia coli*, NikR. Cette dernière, *in vivo*, contrôle uniquement l'homéostasie du Ni(II) en réprimant l'expression transcriptionnelle du transporteur NikABCDE. Cependant, *in vitro*, elle peut être activée par différents métaux.

Les difficultés expérimentales rencontrées lors de l'étude des propriétés de métallation d'EcNikR nous ont amenés à ne plus travailler exclusivement sur cette dernière mais aussi sur NikR d'*Helicobacter pylori*.

Les études, qui portent sur les propriétés de métallation d'EcNikR (affinité, agrégation, effet du pH) et d'HpNikR (liaison du métal dans le site de haute affinité, effet du pH), font l'objet d'une publication parue dans la revue Biochimie (Fauquant *et al.*, 2006) et d'une communication soumise à JBIC (Diederix *et al.*, soumis à publication).

Une étude comparative des propriétés de liaison à l'ADN d'EcNikR et d'HpNikR a également été entreprise. Pour l'étude faite sur HpNikR, nous nous sommes intéressés à sa liaison sur quatre séquences opératrices, pour tenter de répondre à plusieurs questions :

- Les interactions HpNikR/ADN mises en jeu lors de l'activation ou de la répression de l'expression transcriptionnelle des gènes diffèrent-elles ?
- Comment s'effectue la régulation de l'expression des gènes de la région intergénique *nikR-exbB* par HpNikR en fonction des métaux ?

Pour répondre à la première question, nous nous sommes intéressés à la liaison d'HpNikR sur les séquences opératrices *pureA* et *pnixA* qui sont en amont des gènes codant pour l'uréase et la transporteur du Ni(II) NixA respectivement. Pour cela des études en EMSA et en anisotropie de fluorescence ont été réalisées et complétées par des essais de cristallogénèse faits par nos collaborateurs de l'ESRF.

Pour répondre à la seconde question, nous avons étudié la liaison d'HpNikR sur la région intergénique en utilisant deux techniques : l'EMSA (liaison sur des séquences opératrices individuelles) et un test de protection à la nucléase (liaison sur la région intergénique entière). Parallèlement à ces travaux, une caractérisation d'HpFUR qui est capable de se lier sur cette même région intergénique *nikR-exbB*, a été réalisée et fera l'objet d'une publication qui est en cours de rédaction. L'étude portant sur la liaison à la région intergénique nécessite des travaux complémentaires afin de caractériser, entre autre, les effets réciproques des métallorégulateurs HpNikR et HpFUR sur leur liaison à l'ADN.

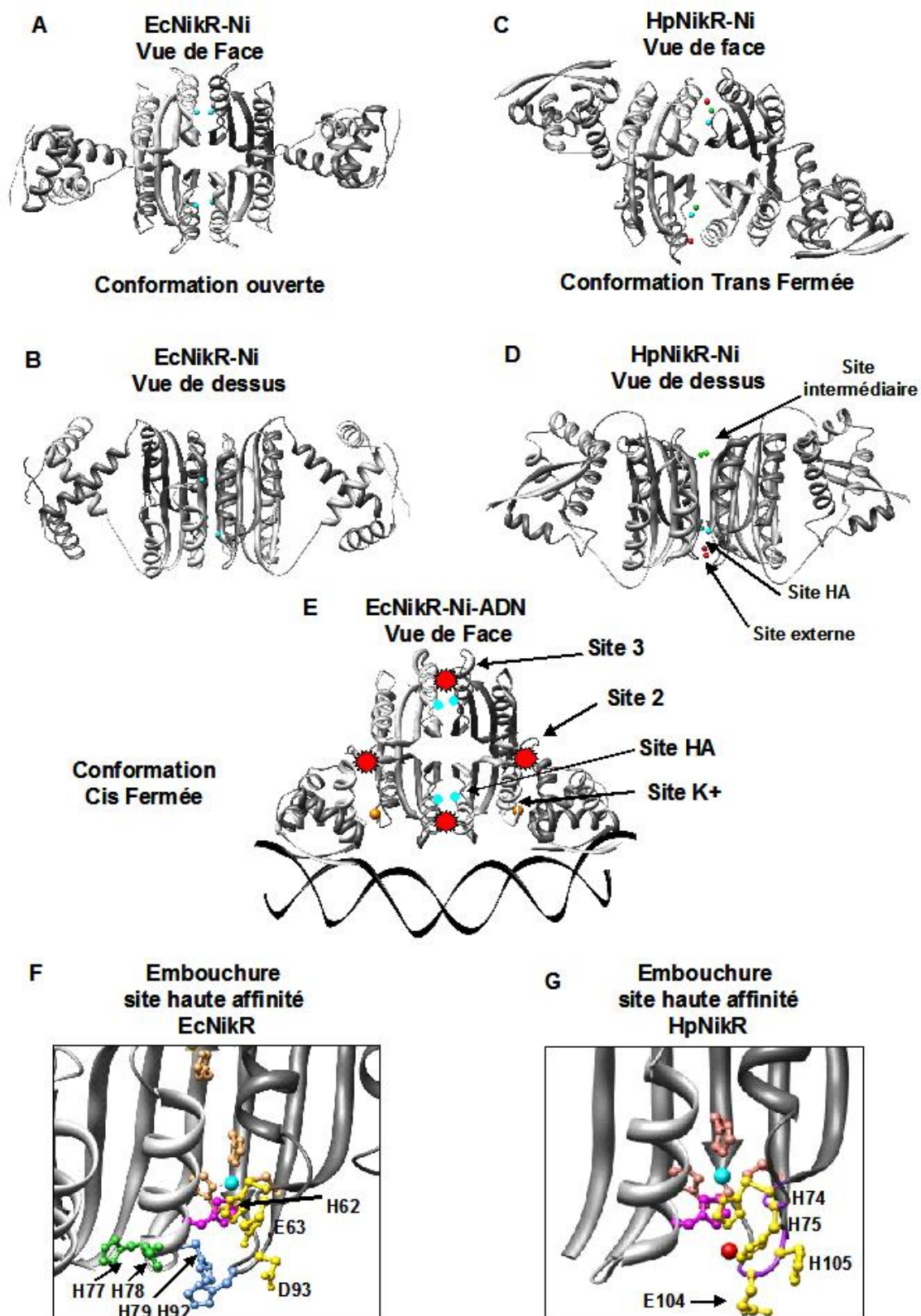
Une synthèse des études faites lors de cette thèse et des données abondantes et récentes de la littérature nous permet de proposer des mécanismes hypothétiques généraux d'activation par les métaux des 3 métallorégulateurs sur lesquels nous avons travaillé même si nous n'avons pas pu répondre à tous nos questionnements (Figure VI.2).

VI.1. Comparaison des propriétés de métallation d'Ec et d'HpNikR

Au cours de cette étude, nous avons montré qu'EcNikR et HpNikR étaient en mesure de lier 1 équivalent de Ni(II) par sous unité monomérique dans un site dit de haute affinité (HA) qui lorsqu'il est métallé, présente une signature spectroscopique particulière. Ces deux métalloprotéines qui sont des tétramères, ont donc 4 sites HA (Fauquant *et al.*, 2006). Des données similaires ont été décrites dans la littérature (Abraham *et al.*, 2006; Dosanjh *et al.*, 2007). La métallation de ce site chez EcNikR ne s'effectue pas directement. En effet le Ni(II) serait, dans un premier temps, lié dans un site silencieux avant que le nickel n'atteigne le site de haute affinité (Diederix *et al.*, soumis à publication). Un cluster d'histidines (H77_{Ec}, H78_{Ec}, H79_{Ec} et H92_{Ec}) présent à l'embouchure du site HA pourrait constituer ce site transitoire (Figure VI.1F). Ce site potentiel n'existerait pas chez HpNikR et NikR de *Pyrococcus horikoshii* (PhNikR).

Cependant d'après les données RX, la métallation du site HA d'HpNikR n'aurait pas lieu non plus directement (Dian *et al.*, 2006). Le Ni(II) cheminerait d'un site « réservoir » vers un site intermédiaire pour enfin être lié par le site HA (Figure VI.1C et G). Ce site « réservoir » serait proche d'un site externe préformé et pourrait donc impliquer les ligands identifiés dans une des structures RX d'HpNikR métallée : H74_{Hp}, H75_{Hp}, E104_{Hp}, H105_{Hp} (réseau de liaisons hydrogènes) (Figure VI.1G). Les résidus équivalents de H74_{Hp} et H75_{Hp} chez PhNikR, H64_{Ph} et D65_{Ph}, sont également impliqués dans la coordination du Ni(II) dans un site auxiliaire présent à l'embouchure du site HA (Chivers & Tahirov, 2005).

Figure VI.1 Comparaison des structures d'EcNikR et d'HpNikR métallées au Ni(II) en présence ou en absence d'ADN. A-B) Structures cristallographiques d'EcNikR-Ni(II) vue de face et de dessus (Schreiter *et al.*, 2006). C-D) Structures cristallographiques d'HpNikR-Ni(II) vue de face et de dessus afin de marquer la présence d'une asymétrie à l'interface de tétramérisation avec un côté « verrouillé » comprenant les sites métalliques HA et externe et avec un côté « non verrouillé » comprenant les sites intermédiaires (Dian *et al.*, 2006). E) Structure cristallographique du complexe EcNikR-Ni-ADN sur laquelle ont été précisés deux sites métalliques observés lors du trempage des cristaux avec un excès de Ni(II) (site3 et site2) (Schreiter *et al.*, 2006). F-G) Visualisation des ligands potentiels du site « réservoir » à l'embouchure du site de haute affinité chez EcNikR et HpNikR respectivement (en jaune et en bleu). Les résidus du cluster d'histidines présents à l'embouchure du site de haute affinité chez EcNikR sont précisés en vert et en bleu. Les sphères bleues précisent le Ni(II) du site de haute affinité. La sphère rouge précise le Ni(II) du site externe, la molécule de citrate ainsi que les ligands impliqués dans le réseau de liaisons hydrogènes de ce site ne sont pas précisés. Les ligands du site de haute affinité sont en rose foncé (H76_{Ec}' et H88_{Hp}') et clair (H87_{Ec}, 89_{Ec}, C95_{Ec} et H99_{Hp}, 101_{Hp}, C107_{Hp}).



Les résidus équivalents de H74_{Hp}, H75_{Hp}, E104_{Hp}, H105_{Hp} chez EcNikR sont H62_{Ec}, E63_{Ec}, H92_{Ec}, D93_{Ec}. Aucun site impliquant ces quatre résidus n'a été identifié jusqu'à présent chez EcNikR, même lors du trempage des cristaux des complexes EcNikR-Ni-ADN dans une solution de Ni(II) (Schreiter *et al.*, 2006). Cependant un site impliquant au minimum les résidus H79 et H92 (Figure VI.1 E site 3^{††} et F) a été observé dans ces mêmes conditions de trempage. Le site 3 pourrait alors correspondre au premier site métallé chez EcNikR avant que le Ni(II) n'atteigne le site de haute affinité.

La délétion des résidus H77 à 79 n'a pas modifié la métallation du site de haute affinité du mutant EcNikR 3HA bien que sa structure secondaire en soit affectée (modification probable de l'extrémité de l'hélice $\alpha 3$). Il serait intéressant de connaître la cinétique de métallation du mutant. La délétion du résidu H79_{Ec} a-t-elle accéléré ou au contraire ralenti la métallation du site HA ? L'étude d'un double mutant H79_{Ec} et H92_{Ec} pourrait donner de nouvelles informations sur le cheminement du métal. Une étude de cinétique rapide couplée au « freeze quench » permettrait également l'étude du complexe intermédiaire de métallation d'EcNikR (caractérisation du site métallique par des mesures spectroscopiques).

Les sites de haute affinité chez EcNikR sont *a priori* tous équivalents (Figure VI.1 A, B), contrairement à ceux d'HpNikR. Les sites HA d'HpNikR seraient égaux deux à deux : 2HA et 2HA'. Cette distinction entre les sites HA d'HpNikR avait été suggérée lors de la résolution de la structure RX d'HpNikR-Ni (Figure VI.1D) qui à la différence d'EcNikR-Ni (Figure VI.1B) et de PhNikR exhibe une organisation asymétrique à l'interface de tétramérisation (Dian *et al.*, 2006).

Nos données suggèrent que la métallation des deux premiers sites de haute affinité permettrait un changement conformationnel significatif. Ce changement pourrait avoir lieu à l'interface de tétramérisation d'après les données de fluorescence de l'ANS obtenues chez HpNikR WT et le mutant M1. Ce changement pourrait permettre la métallation des deux derniers sites et faciliter éventuellement un basculement des domaines de liaison à l'ADN. Nous proposons que la métallation des deux premiers HA tende à « fermer » l'espace non verrouillé d'HpNikR.

Dernièrement le groupe de S. Ciurli a montré par une méthode directe (ITC) que les sites de haute affinité d'HpNikR ne présentaient pas un K_d de l'ordre du picomolaire comme cela avait été proposé par le groupe de D. Zamble (Abraham *et al.*, 2006), mais plutôt un K_d de l'ordre de la dizaine de nanomolaires (Zambelli *et al.*, 2007). Deux sites HA auraient une

^{††} La nomenclature « site 3 et site 2 » a été définie par Schreiter *et al.* (Schreiter *et al.*, 2006)

constante de dissociation d'environ 10 nM et les deux autres HA' auraient une constante de dissociation d'environ 100 nM. Les affinités de ces sites pour le Ni(II) seraient dépendantes du pH.

D'après nos données l'affinité des sites HA/HA' d'HpNikR pour le métal suit la série d'Irving-Williams à savoir $Mn(II) \ll Co(II) < Ni(II) < Cu(II)$ comme c'est le cas d'EcNikR (Wang *et al.*, 2004).

Il semblerait que le Cu(II) lie des sites HA/HA' équivalents à ceux liant du Ni(II). Par contre le Co(II) semble être lié par une seule classe de site HA présentant une géométrie pentacoordonnée et impliquant 1 résidu cystéine. Il serait intéressant de résoudre la structure RX d'HpNikR en présence de Co(II) et de Cu(II) afin de connaître les variations existantes au niveau des sites HA ainsi qu'au niveau structural (changements conformationnels induits). Il serait également intéressant de résoudre la structure d'HpNikR avec ses 4 sites de haute affinité métallés afin de s'assurer que les ligands impliqués dans la sphère de coordination sont identiques entre HA et HA' et de savoir si la géométrie du site est parfaitement identique. Le site HA caractérisé chez HpNikR a une géométrie plan carré et implique les ligands H99, H101, C107 d'une première sous unité et le ligand H88' d'une seconde sous unité (Figure VI.1 G) (Dian *et al.*, 2006). Le site HA', quant à lui, contiendrait toujours la cystéine dans sa sphère de coordination du métal d'après les mesures en spectroscopie d'absorption UV-Visible.

Récemment, la caractérisation par spectroscopie d'absorption des rayons X des sites de haute affinité métallés au Cu(II) et au Co(II) chez EcNikR a été réalisée (Leitch *et al.*, 2007). Le site HA métallé au Cu(II) présenterait bien une géométrie identique à celle observée pour le site à Ni(II), à savoir une géométrie plan carré comme chez HpNikR. La métallation d'EcNikR par ces deux métaux (Ni/Cu) tendrait à induire les mêmes types de changements conformationnels à la différence du Co(II).

Au cours de ce travail, nous avons également montré que le Kd des sites HA d'EcNikR n'était pas de l'ordre du picomolaire mais bien de l'ordre du submicromolaire (Diederix *et al.*, soumis à publication). Pour cela nous avons utilisé trois techniques de mesure directe : la spectroscopie d'absorption UV-Vis, les mesures de cinétique rapide et la technique de liaison sur filtre. Une détermination de l'affinité en utilisant l'ITC devrait être initiée prochainement en collaboration avec le groupe de S. Ciurli.

HpNikR et EcNikR auraient donc des affinités comparables pour le nickel.

Ces différents travaux menés pour déterminer le K_d du site de haute affinité d'Ec et HpNikR pour le nickel, montrent que l'utilisation des techniques indirectes doit être faite avec précaution.

Au-delà de la métallation du site de haute affinité chez EcNikR, cette dernière peut lier jusqu'à 7 Ni(II) par sous unité monomérique avec un $K_{d_{Ni}}$ moyen de 2,2 μ M. La liaison de ces Ni(II) additionnels est responsable de l'agrégation de la protéine qui est déjà maximale après l'addition de 2 Ni(II) supplémentaires par tétramère. La métallation et l'agrégation d'EcNikR sont non seulement métal-dépendantes mais aussi pH-dépendantes. L'acidification des tampons tend à diminuer l'affinité des sites métalliques pour le Ni(II). Dans ces conditions, l'agrégation de la protéine peut être retardée. Nous avons proposé que le pKa d'agrégation soit de 5,4. Ce pKa est proche du pKa de la chaîne latérale des résidus histidines (pKa : 6), nous avons donc suggéré que la précipitation était dépendante de sites métalliques comprenant des résidus histidines dans la sphère de coordination. Le cluster d'histidines présent à l'embouchure du site de haute affinité a également été proposé comme site de basse affinité (BA) capable d'induire l'agrégation. La délétion des résidus H77, 78 et 79 n'a pas modifié la capacité d'agrégation de la protéine. Ce site ne doit pas être impliqué ou du moins pas uniquement dans l'agrégation de la protéine.

Nous avons pareillement montré qu'HpNikR pouvait lier des métaux additionnels dans des sites de plus basse affinité après que ses sites de haute affinité soient métallés. Cette liaison engendre également une agrégation de la protéine mais beaucoup moins rapidement qu'avec EcNikR. L'un de ces sites additionnels pourrait être un site externe modifié d'après les données RX. D'après nos données de double métallation Ni(II)/Co(II) et Co(II)/Ni(II), la métallation du site de haute affinité serait suivie de la métallation d'une classe de site penta ou hexacoordonnée n'impliquant pas de cystéine dans leur sphère de coordination. Leur métallation serait ensuite suivie de la métallation de sites capables d'induire l'agrégation. Cette dernière serait retardée à pH acide. D'après le groupe de S. Ciurli, HpNikR lierait au moins 3 autres Ni(II) par sous unité monomérique en plus du Ni(II) contenu dans le site de haute affinité ; leur K_d serait d'environ 0,5 μ M (Zambelli *et al.*, 2007).

De nombreuses similitudes existent entre EcNikR et HpNikR. Bien que nos données nous aient permis de caractériser des sites ou d'identifier des éventuels changements conformationnels, elles ne nous renseignent pas sur l'évolution des conformations (ouverte, trans ou cis fermée) de la protéine. *A priori*, ces différentes conformations adoptées par les protéines NikR seraient en équilibres, eux-mêmes sensibles à la présence des métaux et/ou de l'ADN.

Des expériences de cross-link couplées à des études de liaison à l'ADN pourraient éventuellement nous permettre de suivre le déplacement des domaines de liaison à l'ADN en fonction du métal ajouté.

VI.2. Comparaison des propriétés de liaison d'Ec et d'HpNikR à l'ADN

Un schéma intégratif représentant les mécanismes hypothétiques généraux mis en jeu pour l'activation d'EcNikR et HpNikR est présenté ci-après (Figure VI.2).

EcNikR métallée se lie sur une unique séquence opératrice qui chevauche le promoteur de l'opéron *nik* et en réprime l'expression transcriptionnelle (Chivers & Sauer, 2000). Les gènes de cet opéron codent pour un transporteur ABC spécifique du Ni(II) chez *E.coli* : NikABCDE. Au cours de ces travaux, nous avons montré que l'agrégation métal-dépendante de la protéine perturbait la liaison à l'ADN d'EcNikR ainsi que la stoechiométrie de liaison à savoir 1 tétramère pour 1 ADN et par delà l'analyse quantitative. Un tel comportement n'avait pas été clairement rapporté dans la littérature.

Le fait d'avoir revisité les Kds des sites HA (~100nM) et BA (~2,2μM) pour le Ni(II), nous a conduits à remettre en cause le modèle de « contrôle à deux niveaux » de l'expression de l'opéron *nik* par EcNikR proposé dans la littérature (Bloom & Zamble, 2004; Chivers & Sauer, 2002).

Les données d'EMSA et d'empreintes à la DNaseI qui ont conduit à l'établissement de ce modèle sont les suivantes : en présence de Ni(II), en conditions stoechiométriques, EcNikR se lierait à l'ADN avec une affinité moyenne ($K_d \sim 5\text{-}50\text{nM}$) ; alors qu'en présence d'un large excès de métal, elle se lierait avec une haute affinité ($K_d \sim \text{pM}$) suite à la métallation d'un potentiel second site.

Selon nous, ces deux niveaux de régulation ne sont pas vraisemblables car l'affinité pour l'ADN qui a été mesurée en conditions stoechiométriques, reposait sur le fait qu'EcNikR était 100% métallée dans son site de haute affinité. Cependant en considérant, un K_d d'une centaine de nanomolaires au lieu de 7pM, la protéine ne serait pas 100% active. C'est la raison pour laquelle lorsqu'un excès de métal est ajouté, l'affinité est augmentée. Un constat similaire peut d'ailleurs être fait chez HpNikR (Abraham *et al.*, 2006; Benanti & Chivers, 2007).

Par ailleurs l'excès de Ni(II) provoquerait également la métallation des sites de basse affinité. Cette métallation tendrait d'une part à augmenter la charge positive de la protéine comme cela a été suggéré par Schreiter *et al.* et donc à améliorer sa liaison à l'ADN (augmentation de l'affinité) (Schreiter *et al.*, 2006). D'autre part, cette métallation favoriserait l'agrégation de la protéine. Un équilibre entre les formes non agrégées et agrégées d'EcNikR serait mis en jeu pour la liaison à l'ADN. Il serait fonction de la concentration en protéine, en ADN et en métal. Un tel équilibre doit également exister pour la liaison d'HpNikR à l'ADN même si celle-ci présente moins de sites de basse affinité et semble moins sujette à la précipitation.

Un des sites de basse affinité pourrait correspondre aux sites à K^+ , coordonné entre autre par les résidus E30 et D34, décrits dans la structure cristallographique du complexe EcNikR-Ni-ADN (Schreiter *et al.*, 2006). Ce site est important pour la liaison à l'ADN d'EcNikR. En effet, il a été montré que la délétion de ces résidus E30 et D34 inhibait la liaison à l'ADN d'EcNikR. Ce site est situé entre les domaines de liaison à l'ADN et de tétramérisation.

La métallation de ce site stabiliserait la protéine dans une conformation cis fermée. Lors de la résolution de la structure de PhNikR métallée (cristaux trempés dans du Ni(II)), un site équivalent à Ni(II), coordonné par les ligands E32 et D36, a également été décrit. Il a donc été proposé que le site à K^+ identifié dans la structure soit plutôt un site à Ni(II) en solution même si les ligands de coordination impliqués ne sont pas spécifiques d'un Ni(II) (Leitch *et al.*, 2007). Leitch *et al.* ont montré qu'en présence d'ADN, un site métallique présentant un stoechiométrie de 2 Ni pour 1 tétramère était stabilisé. Cette stoechiométrie bien que significative pour leur étude est uniquement dépendante de la quantité de métal mise en présence. Ce site aurait une géométrie octaédrique et impliquerait 2 résidus imidazoles et 4 résidus N/O.

Il est peu probable que ce site à Ni(II) soit localisé à la place du site K^+ à moins que la sphère de coordination soit complétée par deux résidus histidines comme His123 et 125 qui verraient leurs chaînes latérales réorientées.

Un autre site à Ni(II) pouvant éventuellement stabiliser le complexe ADN/Protéine est un des sites identifiés lors du trempage des cristaux des complexes EcNikR-Ni-ADN dans du Ni(II). Ce site contient au minimum les histidines 125 et 125' présentes sur le brin $\beta 5$ à la jonction entre les domaines de liaison à l'ADN et de tétramérisation (Figure VI.1 E site 2) et pourrait également correspondre au site identifié par Leitch *et al.*.

Concernant les propriétés de liaison à l'ADN d'HpNikR, elles sont plus complexes. HpNikR métallée est en mesure de contrôler l'expression de très nombreux gènes parmi lesquels - ceux codant pour l'uréase qui sont induits, - ceux codant pour (i) une perméase à Ni(II) NixA, (ii) un système énergétique ExbB/ExbD/TonB ou encore (iii) son propre gène, qui eux, au contraire sont réprimés. Le mécanisme par lequel s'effectue le contrôle positif ou négatif de la transcription n'est pas connu. HpNikR ne reconnaît qu'un seul motif consensus qui serait assez différent du motif palindromique reconnu par EcNikR-Ni. Son mode de régulation pourrait dépendre uniquement du positionnement de la séquence opératrice par rapport au promoteur et/ou de la nature du complexe formé (conformation particulière de la protéine). Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la liaison d'HpNikR sur quatre séquences opératrices. Nous avons montré qu'HpNikR pouvait se lier sur les séquences opératrices des promoteurs *pureA*, *pnixA*, *pnikR* (*NiFu*) et *pexbB* (*nikRS2*) en suivant la stoechiométrie de liaison 1 tétramère pour 1 ADN. Nous avons également montré qu'HpNikR ne présentait pas la même affinité relative selon les séquences opératrices et ceci de façon métal-dépendante. HpNikR lie du métal dans deux classes de sites : les sites HA/HA' (Kd : 10 et 100nM) et les sites de plus basse affinité (Kd : 0,5μM).

En présence d'un excès de Ni(II), de Mn(II) ou de Mg(II), HpNikR se lie à *pureA* et à *pnixA* avec un Kd de l'ordre du nanomolaire. Par contre, dans ces conditions métalliques, elle ne se lie à *NiFu* et à *nikRS2* qu'avec un Kd de l'ordre du micromolaire. La présence additionnelle du Mn(II) (ou du Co(II)) au Ni(II) permet à HpNikR de se lier à *NiFu* et à *nikRS2* avec un Kd de l'ordre de la trentaine de nanomolaires. Le Mn(II) (ou Co(II)) agit de façon additive au Ni(II) pour la liaison d'HpNikR à *NiFu* et à *nikRS2* en étant lié dans un ou plusieurs sites de basse affinité stabilisateurs.

Dans tous les cas, une stabilisation par métallation dans des sites de basse affinité explique les résultats que nous observons. Cette stabilisation est due à une protection vis-à-vis de l'agrégation et/ou une stabilisation du complexe ADN/protéine. La métallation dans ces sites stabilisateurs est métal- et séquence-dépendantes.

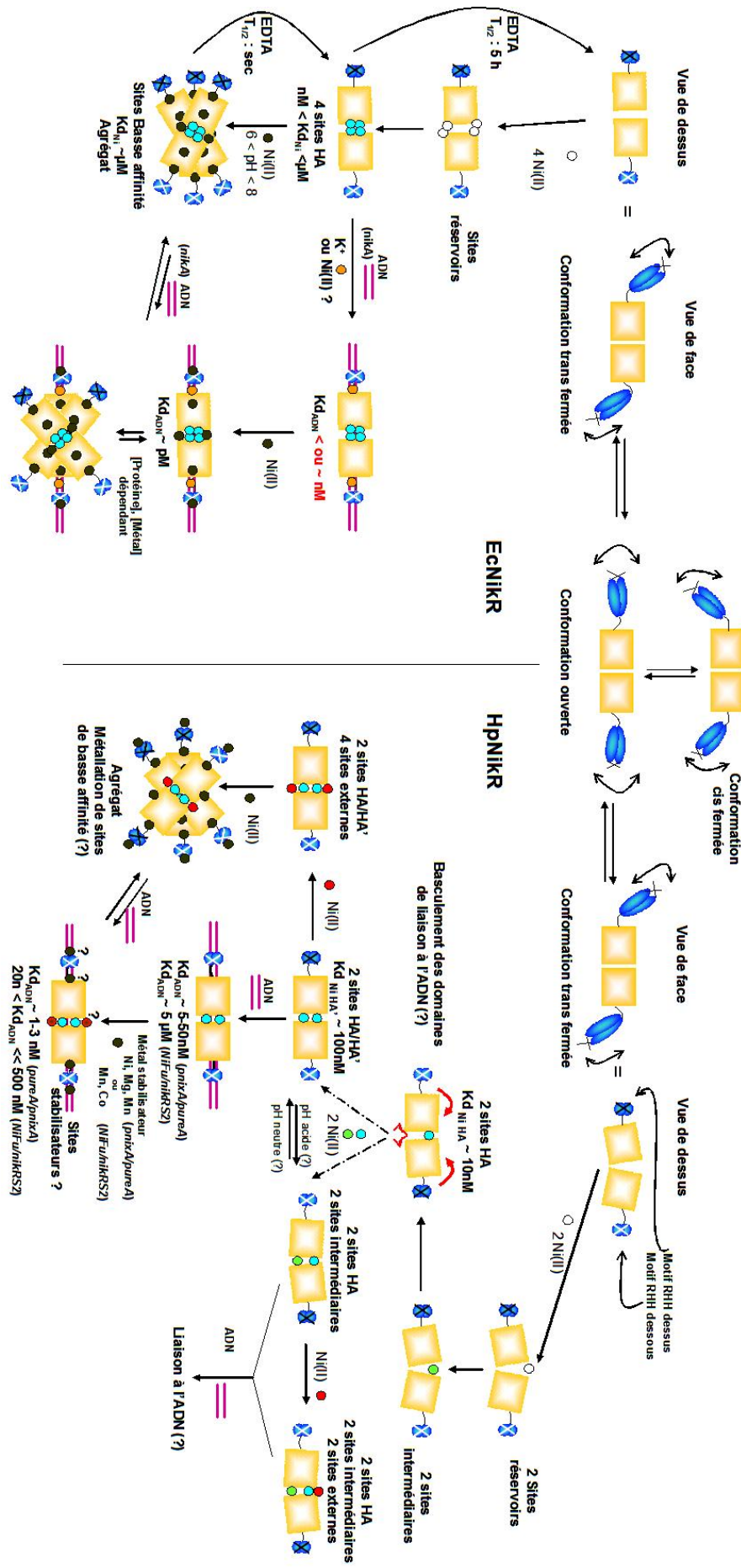
Les sites de stabilisation chez HpNikR peuvent être le site externe, le site interdomaine (équivalent au site à K⁺ chez EcNikR-Ni-ADN) et/ou un site au niveau de l'extension N-ter impliquant les résidus D7 et D8. D'après la littérature, la métallation de ce dernier site (sphère de coordination propre à la protéine ou mixte avec des ligands de l'extension N-ter et l'ADN) permettrait d'expliquer la stabilisation du complexe HpNikR-Ni-*pnixA* (Benanti & Chivers, 2007). Il n'en serait pas de même pour la liaison sur *pureA*. L'extension N-ter ne jouerait

donc pas le même rôle dans le recrutement des cations stabilisateurs selon la séquence à lier. Cette différence pourrait venir du fait que des interactions entre l'extension N-ter et l'ADN sont plus ou moins créées selon la séquence impliquée. Il n'y a pas de distinction évidente dans les séquences opératrices liées que ce soit entre les 2 demi-sites ou aux abords externes des demi-sites.

Dans cette même étude, il a été montré que la délétion des résidus E39_{Hp} et D43_{Hp} (résidus équivalents à ceux du site à K⁺ chez EcNikR) n'avait aucune répercussion sur la liaison d'HpNikR à *pnixA* (Benanti & Chivers, 2007). Il a de ce fait été proposé que ce site n'était pas conservé en raison de la contrainte stérique imposée à la protéine par un espacement plus restreint entre les motifs reconnus par HpNikR par rapport à celui entre les motifs reconnus par EcNikR (11pb au lieu de 16pb). Il serait tout de même intéressant de connaître l'impact des délétions individuelles et doubles de E39 et D43 sur la liaison d'HpNikR sur *pureA*, *pnikR*, et *pexbB*.

Par ailleurs, il a été montré dans la littérature que cette extension Nter serait impliquée dans la spécificité de liaison d'HpNikR à l'ADN (Benanti & Chivers, 2007). Sa délétion tendrait à diminuer la spécificité et à augmenter l'affinité de liaison sur *pnixA*, *pureA*, *pnikR*... Il serait intéressant de connaître l'impact de la délétion de l'extension Nter sur la liaison d'HpNikR sur *NiFu* et sur *nikRS2* en fonction des stress métalliques imposés.

Figure VI.2 Mécanismes hypothétiques généraux pour l'activation d'EcNikR et HpNikR : de l'acquisition du métal à la liaison à l'ADN. En absence de métal, Ec et HpNikR existeraient sous différentes conformations (ouverte, trans ou cis fermée) à l'équilibre et ne seraient pas en mesure de se lier à l'ADN. Ces dernières présentent des différences structurales notables avec, entre autres, une asymétrie à l'interface de tétramérisation. La liaison du métal dans les sites de haute affinité (HA) d'Ec et HpNikR se fait progressivement avec la métallation de sites « réservoirs » puis intermédiaires dans le cas d'HpNikR. Les sites HA d'HpNikR, contrairement à ceux d'EcNikR, ne seraient pas équivalents. La métallation des 2 premiers sites HA d'HpNikR induirait des changements à l'interface de tétramérisation facilitant la métallation des deux derniers sites HA' et éventuellement un basculement des domaines de liaison à l'ADN. Dans ces conditions de métallation, EcNikR et HpNikR seraient en mesure de se lier à l'ADN avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. Pour EcNikR, sa liaison à l'ADN nécessiterait la métallation d'un site interdomaine (site K⁺/Ni(II) ?) qui stabiliserait la conformation Cis-Fermée. Ce site interdomaine ne serait pas *a priori* conservé chez HpNikR. En présence d'un large excès de métal, l'affinité de liaison à l'ADN d'EcNikR et d'HpNikR se voit augmentée. En absence d'ADN, EcNikR et HpNikR peuvent lier du métal dans des sites annexes qui sont en mesure d'induire l'agrégation de ces protéines même si l'agrégation d'HpNikR est moins précoce. Il existerait un équilibre métal- et concentration de protéine dépendant entre les formes agrégées, non agrégées pour la liaison à l'ADN.



Au cours de cette étude portant sur la liaison à l'ADN d'HpNikR, nous n'avons pas entièrement répondu aux questions initialement posées, mais par contre nous avons clairement mis en évidence une différence de réactivité d'HpNikR métallée qui est fonction des métaux disponibles et de la séquence à lier. Nous sommes à même de nous demander si la réactivité d'HpNikR *in vivo* est aussi dépendante des métaux disponibles, HpNikR peut-elle être activée ou du moins stabilisée par un métal autre que le nickel *in vivo* ?

VI.3. La caractérisation d'HpFUR

Avant d'étudier l'effet d'HpFUR sur la liaison d'HpNikR sur la région intergénique *nikR-exbB*, nous avons procédé à sa caractérisation. Les principales informations sont présentées dans la Figure VI.3. Nous avons pu confirmer expérimentalement des propriétés prévisibles d'après les analogies avec d'autres protéines FUR.

Nous avons montré qu'HpFUR native (non « taggée ») est bien une protéine homodimérique. Elle présente au minimum deux sites métalliques par sous unité monomérique. Le premier site, présent dans la forme native purifiée, contient 1 ion Zn(II). Il semble avoir un rôle structural puisque sa démétallation par traitement d'un agent chélateur conduit à une forme monomérique de HpFUR. Ce site pourrait impliquer les cystéines du motif CX₂C-n-CX₂C pour coordonner ce métal.

Cette forme métallée à zinc doit correspondre à la forme apo décrite dans la littérature. Cependant aucune donnée relatant le contenu métallique de cette protéine, dans la littérature, n'est disponible alors qu'il s'agit d'un point critique pour la proposition des mécanismes d'activation d'HpFUR.

Le second site métallique peut lier différents métaux *in vitro* comme le Co(II), le Ni(II), le Mn(II) ou encore le Zn(II) avec un K_d de l'ordre du micromolaire. Le site reconstitué à Co(II) serait penta ou hexacoordonné et ne comprendrait pas de cystéine dans sa sphère de coordination. Bien que ces 4 métaux puissent être liés dans le site 2, ils tendraient à conférer des propriétés d'activation différentes pour HpFUR (changements conformationnels variables). En effet, HpFUR ne peut se lier sur sa séquence individuelle *furS2*, en test nucléase, qu'en présence de Co(II), de Mn(II) et de Ni(II). Le zinc, bien qu'ayant été lié dans le site 2, ne doit pas conférer à la protéine la bonne conformation. Il est probable que la géométrie même du site 2 à zinc soit différente de celle du site 2 à Co(II).

Nous avons également montré qu'HpFUR ne tendait pas à s'oligomériser sur l'ADN à partir d'une liaison sur *furS2* puisque aucune protection du site *nikRS2* n'a été constatée en présence ni même en absence de métal. Enfin nous avons également observé en EMSA de façon

préliminaire qu'HpFUR pouvait se lier à *NiFu* en présence de Mn(II) et de Ni(II). Ces différents aspects sont en accord avec les résultats d'empreintes à la DNaseI de la littérature (Delany *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter le fait qu'HpFUR-Ni(II) soit capable de se lier à *furS2* et *NiFu*. Cela voudrait dire que le contrôle de l'expression de *exbB* et *nikR* pourrait se faire non seulement par HpFUR-Fe(II) et HpNikR-Ni(II) mais aussi par HpFUR-Ni(II). Le rapport des concentrations entre les deux métallorégulateurs et les ions métalliques disponibles (ainsi que le pH) doit permettre de réguler plus finement cette région intergénique de façon à faire face à différentes situation de stress : carence et surcharge en fer ou nickel, stress acide et peut-être même stress oxydant.

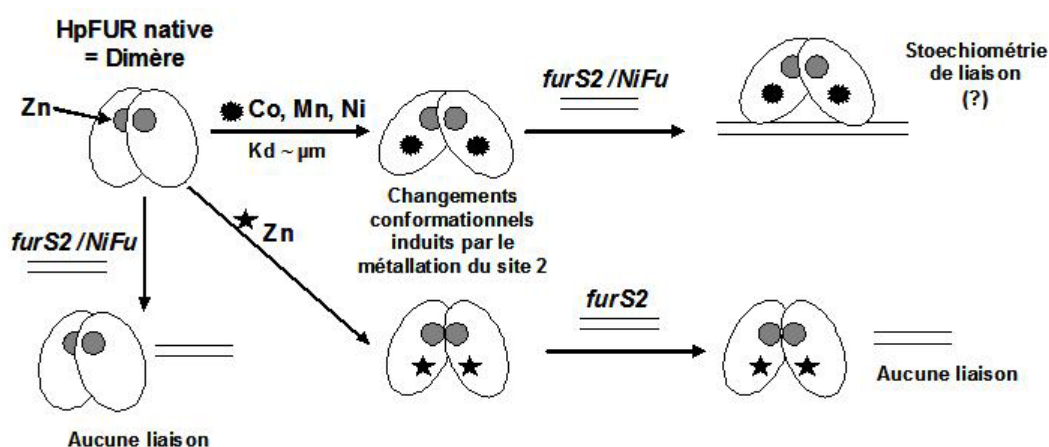


Figure VI.3 Mécanisme d'activation d'HpFUR pour sa liaison sur la séquence intergénique *nikR-exbB*. HpFUR, protéine homodimérique, contient nativement du Zn dans un site structural. Dans ces conditions, HpFUR ne peut se lier à *NiFu* et *furS2*. La métallation d'un second site dit de régulation induit des changements conformationnels nécessaires pour qu'HpFUR puisse se lier à l'ADN. Les changements conformationnels induits par le Zn, quant à eux, ne permettent pas à HpFUR de se lier à l'ADN. HpFUR, HpFUR-Mn/Co/Ni et HpFUR-Zn doivent présenter des structures différentes.

D'après la littérature, HpFUR apo et métallée sont en mesure de se lier à l'ADN, cela signifie qu'elles peuvent s'y lier avec différentes conformations. Il serait informatif de résoudre la structure de la forme apo et métallée au Mn(II) pour connaître les différences structurales. Par ailleurs, il est décrit qu'HpFUR apo et métallée peuvent activer ou réprimer la transcription des gènes (gènes dépendants). Il serait intéressant de comprendre quels mécanismes sont mis en jeu pour expliquer ces différences de comportement. S'agit-il uniquement d'un positionnement particulier de la séquence opératrice par rapport au promoteur, ou les complexes de liaison sont-ils particuliers (stoechiométrie...)? Il est également notable qu'HpFUR, tout comme HpNikR, présente une extension N-ter de 10 résidus qui n'est pas conservée chez les protéines FUR. Cette extension joue-t-elle un rôle particulier dans les mécanismes de liaison à l'ADN ? Serait-elle impliquée dans des interactions avec l'ARN

polymérase dans le cadre d'une activation de la transcription des gènes ? Une étude des propriétés structurales, de métallation, de liaison à l'ADN *in vitro* et d'activation *in vivo* avec une protéine HpFUR dépourvue de cette extension serait enrichissante pour l'appréhension des mécanismes d'action d'HpFUR.

Même si de nombreuses questions restent sans réponse actuellement, nous sommes maintenant en mesure d'étudier l'effet d'HpFUR sur la liaison d'HpNikR sur la région intergénique *via* le test de protection à la nucléase que nous avons construit.

En conclusion, l'ensemble de ce travail nous a permis de visualiser la diversité des modes de régulation par les métallorégulateurs NikR et Fur, en particulier chez *Helicobacter pylori* et aussi l'importance des variations de réponses en fonction des conditions imposées. Ceci rend compte de la subtilité de réactivité de ces métallorégulateurs vis-à-vis de différents paramètres : concentration en protéines, nature et concentration en sels métalliques, pH... Cette réactivité qui implique des régulations croisées entre NikR et Fur, peut être liée à une nécessité de survie de ce pathogène dans sa niche écologique.

VI.4. Références

- Abraham, L. O., Li, Y. & Zamble, D. B. (2006). The metal- and DNA-binding activities of *Helicobacter pylori* NikR. *J Inorg Biochem* 100, 1005-1014.
- Benanti, E. L. & Chivers, P. T. (2007). The N-terminal arm of the *Helicobacter pylori* Ni²⁺-dependent transcription factor NikR is required for specific DNA-binding. *J Biol Chem* 282, 20365-20375.
- Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Metal-selective DNA-binding response of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10029-10038.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2000). Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni²⁺-Dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem* 275, 19735-19741.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2002). NikR repressor: high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA. *Chem Biol* 9, 1141-1148.
- Chivers, P. T. & Tahirov, T. H. (2005). Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol* 348, 597-607.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2005). *In vitro* analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187, 7703-7715.
- Dian, C., Schauer, K., Kapp, U., McSweeney, S. M., Labigne, A. & Terradot, L. (2006). Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol* 361, 715-730.
- Diederix, R. E., Fauquant, C., Rodrigue, A., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (soumis à publication). Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II).
- Dosanjh, N. S., Hammerbacher, N. A. & Michel, S. L. (2007). Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA) DNA interaction: metal ion requirements and sequence specificity. *Biochemistry* 46, 2520-2529.
- Fauquant, C., Diederix, R. E., Rodrigue, A., Dian, C., Kapp, U., Terradot, L., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (2006). pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* NikR. *Biochimie* 88, 1693-1705.
- Leitch, S., Bradley, M. J., Rowe, J. L., Chivers, P. T. & Maroney, M. J. (2007). Nickel-specific response in the transcriptional regulator, *Escherichia coli* NikR. *J Am Chem Soc* 129, 5085-5095.
- Schreiter, E. R., Wang, S. C., Zamble, D. B. & Drennan, C. L. (2006). NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13676-13681.
- Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L. & Zamble, D. B. (2004). Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10018-10028.
- Zambelli, B., Bellucci, M., Danielli, A., Scarlato, V. & Ciurli, S. (2007). The Ni(2+) binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)*, 3649-3651.

Chapitre VII

Matériel & Méthodes

VII.1. Matériel plasmidique

VII.1.1. Plasmides obtenus par collaboration

VII.1.1.1. *Plasmides surproducteurs*

Le gène codant pour le mutant Q2E NikR d'*Escherichia coli*, issu du plasmide p8611 (De Pina *et al.*, 1999), a été sous cloné entre les sites de restriction NcoI et HindIII du vecteur pET28a (Novagen). Le plasmide pET28_*nikR* Q2E en résulte et nous a été donné par A. Rodrigue *et al.* (UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Lyon).

Le gène codant pour le mutant H4 NikR d'*Escherichia coli*, a été obtenu par mutagenèse dirigée (H89N) sur le plasmide pET28_*nikR* Q2E. Ce plasmide nous a été donné par A. Rodrigue *et al.* (UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Lyon).

Le gène codant pour NikR WT d'*Helicobacter pylori* (*hp1338*) a été introduit dans le plasmide surproducteur pET11a, le plasmide pILL695 en résulte (Dian *et al.*, 2006). Ce plasmide nous a été donné par H de Reuse *et al.* (Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Institut Pasteur, Paris).

Le gène codant pour le mutant M1 d'HpNikR a été cloné dans le plasmide surproducteur pET11a. Ce gène avait été construit par mutagenèse dirigée appliquée sur le plasmide pILL2224 (Dian *et al.*, 2006). Ce plasmide nous a également été donné par H de Reuse *et al.* (Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Institut Pasteur, Paris).

Le gène codant pour FUR d'*Helicobacter pylori* (*hp 1027*) a été introduit entre les sites de restriction NdeI et BamHI du vecteur plasmidique pET11a, le plasmide pFUR3 en résulte. Cette construction a été faite par K. Schauer (en thèse à l'Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Institut Pasteur, Paris).

VII.1.1.2. *Autres plasmides*

La région intergénique allant du gène codant pour HpNikR au promoteur *pexbB* a été clonée entre les sites de restriction HindIII et BamHI du plasmide pUC18. Le plasmide pIGR1 en résulte. Cette construction a été faite par K. Schauer (en thèse à l'Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Institut Pasteur, PARIS).

Le promoteur *pnikA* (fragment -127 à +27) a été cloné entre les sites de restriction HindIII et HincII du vecteur pUC18. Un site de restriction à la PstI a été créé dans la région centrale de la boîte opératrice de NikR en modifiant la séquence TATGAATTTTA en TATGACGTCTA. Cette mutation ne perturbe pas la liaison de NikR sur sa boîte (Chivers &

Sauer, 2000). Le plasmide pP342 en résulte, il fait 2820 pb. Ce plasmide nous a été donné par A. Rodrigue et al. (UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Lyon).

VII.1.2. Plasmides modifiés par mutagenèse dirigée

Le gène codant pour NikR WT d'*Escherichia coli* a été obtenu par mutagenèse dirigée sur le gène codant pour NikR Q2E. Le plasmide a été nommé pET28_*nikR* WT (Fauquant *et al.*, 2006).

Le gène codant pour NikR 3HA d'*Escherichia coli* a été obtenu par mutation du gène codant pour NikR WT dans le pET28_*nikR* WT. Le plasmide pET28_*nikR* 3HA en résulte.

Le plasmide pHP2S de 3003 pb a été construit à partir du plasmide pIGR1.

VII.1.3. Tableau récapitulatif des plasmides

plasmides	génotype	Références
pET28_ <i>nikR</i> WT	pET28a, insert 910pb avec gène <i>nikR</i> + début du gène <i>rhsB</i> , KanR, T7 prom	Ce travail
pET28_ <i>nikR</i> Q2E	pET28a, insert 910pb avec gène <i>nikR</i> muté + début du gène <i>rhsB</i> , KanR, T7 prom	(De Pina <i>et al.</i> , 1999)
pET28_ <i>nikR</i> 3HA	pET28a, insert 910pb avec gène <i>nikR</i> muté + début du gène <i>rhsB</i> , KanR, T7 prom	Ce travail
pET28_ <i>H4</i>	pET28a, insert 910pb avec gène <i>nikR</i> muté + début du gène <i>rhsB</i> , KanR, T7 prom	(Fauquant <i>et al.</i> , 2006)
pIII695	pET11a, AmpR, T7 prom	(Dian <i>et al.</i> , 2006)
pM1	pET11a, AmpR, T7 prom	(Dian <i>et al.</i> , 2006)
pfur3	pET11a, Insert 459 pb, AmpR, T7 prom	K. Schauer
pIGR1	pUC18, AmpR, lac, 3003 pb	K. Schauer
pP342	pUC18, AmpR, lac, PnikA muté, 2820 pb	(Fauquant <i>et al.</i> , 2006)
pHP2S	pIGR1 muté, AmpR, lac, 3003 pb	Ce travail

VII.2. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été réalisée en utilisant le kit QuikChange® de Stratagen.

VII.2.1. Principe

Ce kit permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant la nature d'un acide aminé, d'insérer ou de déléter un ou plusieurs acides aminés. La méthode repose sur les principes initiaux de la PCR qui comprend trois étapes : le dénaturation de l'ADN, l'hybridation d'amorces et l'élongation de ces dernières par une polymérase.

Cette technique utilise les propriétés de la *PfuTurbo*® DNA polymérase qui réplique les deux brins d'un ADN plasmidique méthylé avec une haute fidélité à partir de deux amorces contenant chacune la mutation désirée. Ces amorces sont complémentaires entre elles et s'hybrident chacune à un des brins de l'ADN plasmidique dénaturé. L'élongation de ces amorces par la *PfuTurbo*® permet la génération d'ADN muté contenant des « nicks ». Une amplification de l'ADN est permise. Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui reconnaît spécifiquement l'ADN méthylé et hémiméthylé (site de reconnaissance : 5'-Gm6ATC-3'). DpnI détruit l'ADN matrice et l'ADN hémiméthylé, sans affecter l'ADN nouvellement synthétisé. Le produit de la digestion est introduit par transformation dans une bactérie capable de combler les « nicks » et ensuite de répliquer le plasmide mutant.

VII.2.2. pET28_*nikR* WT

Le plasmide surproducteur pET28_*nikR Q2E* a été utilisé afin de construire le pET28_*nikR WT*. Ce dernier comprend le gène codant pour EcNikR sauvage. La mutation « reverse » réalisée consiste en une modification du codon GAA (Glu2) en CAA (Gln2). La mutagenèse a été faite en utilisant les amorces suivantes où la mutation est indiquée en italique :

nikR1 5' GAAGGAGATATACCATG**CA**ACGAGTCACCATCACGC 3'

nikR2 5' GCGTGATGGTGACTCGTT**GC**ATGGTATATCTCCTTC 3'

Les conditions de PCR sont les suivantes :

53 ng d'ADN plasmidique-^{CH}₃ matrice, 125ng des amorces 1 et 2, 20nmol de dNTP, 2 unités de *Pfu Turbo*®.

La réaction se déroule dans un volume de 50µl de 20mM Tris/HCl pH8.8, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/mL BSA.

Le programme de PCR est composé de 19 cycles :

- 1 min à 95°C
 - 1 min à 95°C
 - 1 min à 55°C
 - 18 min à 68°C
- 1 cycle

Le produit de PCR est digéré par la DpnI pendant une heure à 37°C afin de dégrader l'ADN matrice. L'amplification est vérifiée sur un gel d'agarose à 1.5% révélé au bromure d'éthidium (BET).

3 µl du produit de PCR ont été utilisés pour transformer des bactéries XL1-Blue compétentes. Les cellules sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du LB agar ainsi que 50µg/mL de kanamycine comme facteur de sélection. Les cellules sont incubées une nuit à 37°C. Un transformant est ensuite mis en culture dans 50 mL de LB avec de la kanamycine afin de produire du plasmide. Le plasmide est extrait avec un Kit « Midiprep » de Qiagen.

VII.2.3. pET28_*nikR* 3HA

Le plasmide pET28_*nikR* WT a été utilisé afin de construire le pET28_*nikR* 3HA. Ce dernier porte le gène codant pour EcNikR mutée sur trois histidines. La mutation réalisée consiste en une modification de trois codons CAT CAC CAC (His 77, 78, 79) en GCT GCC GCC (Ala 77, 78, 79). La mutagenèse a été faite en utilisant les amorces complémentaires suivantes où les mutations sont indiquées en italiques :

nikRH3A 5' GTCTCCACCCAGCAT **GCTGCCGCC**GACCTCTCCGTCGCC 3'
nikRH3B 5' GGCGACGGAGAGGTC **GGCGGCAGC**ATGCTGGGTGGAGAC 3'

Les conditions de PCR sont les suivantes (volume 50 µl) :

54 ng d'ADN plasmidique-^{CH}₃ matrice, 125ng des amorces 1 et 2, 20nmoles de dNTP, 2 unités de *Pfu Turbo*[®].

La réaction se déroule dans un volume de 50µl de 20mM Tris/HCl pH8.8, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/mL BSA.

Le programme de PCR est composé de 18 cycles :

- 2 min à 98°C
 - 2 min à 95°C
 - 1 min à 55°C
 - 18 min à 68°C
- Ces étapes constituent un cycle

Le produit de PCR est ensuite traité comme dans VII.2.2.

VII.2.4. Le plasmide pHP2S utilisé pour le test nucléase

La construction de ce plasmide, faite à partir du plasmide pIGR1 construit par K. Schauer, a été faite en deux temps. Deux sites de restriction sur les 4 d'intérêts ont été créés : l'un dans la boîte d'ADN (gris foncé) liée par HpFUR noté S2 ou furS2, l'autre dans la boîte d'ADN (gris clair) liée par HpNikR noté S3 ou nikRS2. Le site S1 ou NiFu se situe au niveau de la région d'ADN (en rouge) liée par HpNikR et HpFUR. Il est coupé par l'enzyme PsiI (TTA'TAA). Le site S0 ou nikR box se situe au niveau d'une demi dyade (souligné). Il est coupé par BsrBI (CCG'CTC)

```

5' GTCTTTATTGGGTGTATCCATTGAGAAAAATCCTTTTTTGGCATGAGTTCGTTAAAAGCCGC
TCATGCTAGTATGATTGATTAATTTAAAATGAACAATTATAATACAACTGGATTTAATGGTT
GGTCATAAGAGCGTTTGGATTGATTGTAATTATTAGCTTAATCATTATTGACTTGTTATTATTA
AAACAATATAATCAACAAACCAACATTCCTTTATCATTTTTGGAGCATTTATGCGAACGAATGCTT
CTTAAAGAGTGCATGCTCTTAGAGTATGTCTGTATCGCATGTTGCTTTAATCTTAAGGAAATTGT
TTTATCATAGACAAGGAG 3'

```

Figure VII.1 Séquence d'ADN de la région intergénique introduite dans le plasmide pUC18 entre HindIII et BamHI, le plasmide a été nommé pIGR1. Souligné : la nikR Box prédite, Encadré noir : séquence protégée par HpNikR et HpFUR, Encadré gris foncé : la région uniquement protégée par HpFUR et Encadré gris clair : la région uniquement protégée par HpNikR

La mutation, pour créer S2, consiste en une substitution d'une guanine en cytosine. Un site (G'AnTC) coupé par l'enzyme HinfI est créé.

Les amorces utilisées sont les suivantes, la mutation est précisée en italique :

Amorce A 5' TTTGGATTTGATT**CT**AATTATTAGCTTAATCATTATT 3'

Amorce B 5' AATAATGATTAAGCTAATAATTA**GA**ATCAAATCCAAA 3'

La mutation, pour créer S3, consiste en une substitution d'une adénine en thymine. Un site (AAT'ATT) coupé par l'enzyme SspI est créé.

Les amorces utilisées sont les suivantes, la mutation est précisée en italique :

Amorce C 5' ATTGACTTGTATTATTATAAAACAATAT**T**ATCAACAAAC 3'

Amorce D 5' GTTTGTGAT**A**ATATTGTTTAAATAATAACAAGTCAAT 3'

Les conditions de PCR sont les suivantes (volume 100 µl) : création de S2

50 ng d'ADN plasmidique-^{CH}₃ matrice, 240 et 260 ng des amorces A et B respectivement, 30nmol de dNTP, 2 unités de *Pfu Turbo*[®].

La réaction se déroule dans un volume de 50µl de 20mM Tris/HCl pH8.8, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/mL BSA.

Le programme de PCR est composé de 20 cycles :

- 2 min à 98°C
 - 2 min à 95°C
 - 1 min à 55°C
 - 9 min à 67°C
- Ces étapes constituent un cycle

L'amplification ainsi que la réussite de la mutagenèse sont vérifiées sur un gel d'agarose à 1.5% révélé au BET sur lequel le produit de PCR brut et digéré par *HinfI* ainsi que l'ADN matrice digéré ont été déposés.

Le produit de PCR est, alors, digéré par la *DpnI* pendant une heure à 37°C afin de dégrader l'ADN matrice

4 µl du produit de PCR ont été utilisés pour transformer des bactéries XL1-Blue. Les cellules sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du LB agar ainsi que 100µg/mL d'ampicilline comme facteur de sélection. Les cellules sont incubées une nuit à 37°C. Un clone est ensuite mis en culture dans 50 mL de LB avec de l'ampicilline afin de produire du plasmide. Le plasmide est extrait avec un Kit « Midiprep » de Qiagen.

Ce nouveau plasmide méthylé noté AB sert d'ADN matrice pour la création de la seconde mutation.

Les conditions de PCR sont les suivantes (volume 100 µl) : création de S3

50 ng d'ADN plasmidique^{-CH₃} matrice, 230 et 250 ng des amorces C et D respectivement, 30nmoles de dNTP, 2 unités de *Pfu Turbo*[®].

La réaction se déroule dans un volume de 50µl de 20mM Tris/HCl pH8.8, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/mL BSA.

Le programme de PCR utilisé est identique au précédent.

Le produit de PCR est traité comme précédemment, l'enzyme de restriction testée étant *SspI*.

Le nouveau plasmide créé a été nommé pHP2S.

Les plasmides mutés ont tous été séquencés par la société Genome Express.

VII.3. Surproduction et Purification des protéines NikR

VII.3.1. EcNikR

VII.3.1.1. *EcNikR* : sauvage et 3HA

La protéine EcNikR WT a été surproduite à partir de cellules BL21(DE3) fraîchement transformées avec le plasmide pET28_ *nikR* WT. Une pré-culture d'un transformant est faite sur la nuit à 37°C avant de diluer 100 fois la suspension bactérienne dans 3 L de LB contenant de la kanamycine à 50µg/mL.

Après culture des cellules à 37°C sous agitation pour atteindre un $DO_{600} = 0.6$, la surproduction est induite avec de l'IPTG à 0.5 mM final pendant 3 heures. Les cellules sont centrifugées à 6000g pendant 10 minutes à 6°C. Les culots correspondants à 1 L de culture sont resuspendus dans 30 mL de Tris/HCl 20mM pH 8 contenant 50 mM EDTA. La suspension bactérienne est soniquée, sur un bain de glace, pendant 5 cycles de 30 secondes (pulser 3.5 ; amplitude 75-90 ; Tuner < 25%). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 15000g pendant 20 minutes. Le surnageant est dialysé à deux reprises contre 2 L de 20mM Tris/HCl pH 8. Les dialysats sont ensuite traités avec de la DNaseI (24µg/dialysat avec du $MgSO_4$ à 5 mM) pendant 15 minutes à 37°C.

L'extrait brut de protéine est chargé sur une colonne échangeuse d'anions (Resource Q GE Healthcare) équilibrée avec du tampon A (20 mM Tris/HCl pH 8) et 5% de tampon B (20 mM Tris/HCl pH 8, 1 M NaCl). La colonne est lavée par 3 volumes du tampon d'équilibration.

Un gradient de tampon B est mis en place afin d'éluer les protéines « contaminantes », EcNikR WT et l'ADN :

- 3 volumes de colonne pour passer de 5 à 12 % de tampon B
- 5 volumes de colonne à 12 % de tampon B
- 8.5 volumes de colonne pour passer de 12% à 40% de tampon B (EcNikR WT est éluée)
- 6 volumes de colonne : 40 % de tampon B
- 5 volumes de colonne pour passer de 40% à 100% de tampon B
- 5 volumes de colonne à 100 % de tampon B (élution de l'ADN)

La protéine « pré » purifiée est ensuite concentrée sur un Ultrafree (Amicon Ultra, Millipore) de 15 mL avec une limite d'exclusion à 30 kDa.

La dernière étape de purification consiste en une colonne de filtration sur gel (Superdex 75 prep grade (HR16/60) GE Healthcare). La colonne est équilibrée avec du 20 mM Tris/HCl pH8 400mM NaCl (l'addition de DTT à 5mM dans ce tampon est conseillée). Le volume

d'élution de la protéine est approximativement de 53 mL. La pureté de la protéine est vérifiée par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les fractions « pures » sont regroupées et concentrées sur un Ultrafree de 4 mL.

La concentration en protéine est déterminée par un dosage en spectroscopie UV-Visible à 278 nm, le coefficient d'extinction molaire théorique est de $5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La protéine est stockée à -80°C avec 10% de glycérol et du β -mercaptoethanol à 2 mM (l'utilisation de DTT à 5mM doit toutefois être préférée à celle du β -mercaptoethanol qui forme des adduits).

Le rendement de purification est d'environ 30 mg de protéine pure par litre de culture bactérienne.

EcNikR WT avant utilisation doit être décongelée rapidement à 37°C pendant quelques minutes, puis laisser au minimum 1h à 4°C pour faciliter l'équilibration de la protéine (formation d'oligomères indésirables du fait de la congélation). La protéine doit ensuite être retraitée avec un réducteur, puis son tampon doit être changé avant toute expérimentation. EcNikR WT peut être conservée plusieurs semaines à 4°C , sans qu'aucune oxydation ne soit notable (pont dissulfure ou adduit).

Le mutant EcNikR 3HA peut être purifié de la même façon sauf au niveau de la dialyse qui permet de diminuer la salinité de l'échantillon. EcNikR 3HA doit être dialysée contre un tampon 20mM Tris/HCl pH 8, 50mM NaCl et 5mM de MgSO_4 . La protéine peut ensuite être traitée avec la DNaseI avant son chargement sur la colonne.

Le rendement de purification d'EcNikR 3HA est d'environ 20 mg de protéine pure par litre de culture bactérienne.

VII.3.1.2. *EcNikR* : le mutant Q2E

La purification de ce mutant n'est pas réalisée selon le même protocole. Toutefois l'expression de la protéine se déroule selon le même procédé que celui décrit en VII.3.1.1.

Le culot cellulaire (1 L de culture) est resuspendu dans 20 mL de 20mM Tris/HCl pH 8, 300mM NaCl, 10 $\mu\text{g/mL}$ ICT, 4 $\mu\text{g/mL}$ Pepstatine A, 240 $\mu\text{g/mL}$ PMSF, 10% glycérol. La suspension est soniquée sur 10 cycles pendant 30 secondes (pulser 3.5 ; amplitude 90) avec une pause de 5 minutes au 5^{ème} cycle. Le lysat est centrifugé à 20000g pendant 20 minutes à 6°C afin d'éliminer des débris cellulaires, ainsi que de l'ADN. Le surnageant de sonication est chargé sur colonne d'affinité (Chelating sépharose 6B (50/5) GE Healthcare) chargée en nickel.

La colonne est lavée avec 8 volumes de tampon A (20 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl) puis par 3 volumes de tampon A contenant 25mM d'imidazole, suivis de 3 volumes de tampon A avec 50mM d'imidazole et de 4 volumes de tampon A avec 75 mM d'imidazole à pH 8. La protéine est éluée avec 2 volumes de tampon A contenant 250 mM d'imidazole. Afin d'empêcher une éventuelle agrégation de la protéine éluée, 20 mM d'EDTA lui sont ajoutés. La solution de protéine « pré-purifiée » est dialysée sur la nuit à 4°C contre 3 L de tampon B (20 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM EDTA et 2 mM β -mercaptoéthanol). Le dialysat est concentré sur Ultrafree (15 mL, 5 kDa cut-off, Millipore). Le dialysat concentré est injecté sur une colonne de filtration sur gel (Superdex 75 prep grade (HR16/60)) équilibrée avec le tampon B. La protéine « native » est éluée vers 53 mL. Les fractions protéiques sont déposées sur un gel SDS-PAGE. Les fractions pures sont rassemblées et concentrées afin d'être stockées à -80°C.

La concentration en protéine est déterminée par un dosage en spectroscopie UV-Visible à 278 nm, le coefficient d'extinction molaire théorique est de $5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Le rendement de purification est d'environ 40 mg de protéine pure par litre de culture bactérienne.

VII.3.2. HpNikR : Sauvage et le mutant M1

Les protéines HpNikR WT et le mutant M1 ont été surproduites à partir de cellules BL21(DE3) fraîchement transformées avec le plasmide pILL695 et pM1 respectivement. Une pré-culture de chaque transformant est faite sur la nuit à 37°C avant de diluer 100 fois la suspension bactérienne dans 1 L de LB contenant de l'Ampicilline à 150 μ g/mL.

Les cellules poussent à 37°C sous agitation, à $\text{DO}_{600} = 0.7$, la surproduction est induite avec de l'IPTG à 0.5 mM final pendant 3h. Les cellules sont centrifugées à 6000g pendant 10 minutes à 6°C.

Le culot de cellules est resuspendu dans 20 mL de 20 mM Tris/HCl pH 7.4 contenant 100 mM EDTA, 0.5 mL de DMSO contenant 200 mg du cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma). La suspension est soniquée 5 fois pendant 30 secondes dans un bain de glace. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 20000g pendant 20 minutes. Le surnageant est dialysé à 2 reprises à 4°C contre 2 L de 20mM Tris/HCl pH 7.4, 5mM de MgSO_4 . Le dialysat est centrifugé à 20000g pendant 20 minutes à 6°C. Le dialysat soluble est ensuite traité avec de la DNase I (24 μ g/dialysat) pendant 15 minutes à 37°C.

L'extrait brut de protéine est chargé sur une colonne échangeuse d'anions (Resource Q GE Healthcare) équilibrée avec du Tampon A (20 mM Tris/HCl pH 7.4) et 2% de Tampon B (20

mM Tris/HCl pH 7.4, 1 M NaCl). La colonne est lavée par 5 volumes du tampon d'équilibration.

Un gradient de tampon est mis en place afin d'éluer les protéines « contaminantes », HpNikR et l'ADN :

- 3 volumes de colonne pour passer de 2 à 10 % de tampon B
- 8 volumes de colonne à 10 % de tampon B
- 15 volumes de colonne pour passer de 10% à 40% de tampon B (HpNikR est éluée)
- 5 volumes de colonne à 40 % de tampon B
- 5 volumes de colonne pour passer de 40% à 100% de tampon B
- 5 volumes de colonne à 100 % de tampon B (élution de l'ADN)

La protéine « pré » purifiée est ensuite concentrée sur un Ultrafree de 15 mL avec une limite d'exclusion de 30 kDa.

La dernière étape de purification consiste en une colonne de gel filtration (Superdex 75 prep grade (HR16/60)). La colonne est équilibrée avec du 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 400mM NaCl, 5 mM DTT. Le volume d'élution de la protéine est approximativement de 53 mL. La pureté de la protéine est vérifiée par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les fractions « pures » sont regroupées et concentrées sur un Ultrafree de 4 mL.

La concentration en protéine est déterminée par un dosage en spectroscopie UV-Visible à 280 nm, le coefficient d'extinction molaire théorique^{§§} utilisé est de $9770 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (ou $0.57 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), $9650 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour HpNikR WT et HpNikR M1 respectivement. La protéine est stockée à -80°C avec 10% de glycérol.

Le rendement de purification est d'environ 50 mg de protéine pure soluble par litre de culture bactérienne.

La protéine HpNikR avant utilisation doit être décongelée rapidement à 37°C pendant quelques minutes, puis laisser au minimum 1h à 4°C comme EcNikR. La protéine doit ensuite être retraitée avec un réducteur, puis son tampon doit être changé avant toute expérimentation. HpNikR peut être conservée au maximum 3 semaines à 4°C , après quoi cette dernière s'oxyde. La présence d'adduits oxygénés est mesurable par spectrométrie de masse. Ces adduits semblent irréversibles. Il est préférable de conserver la protéine à -80°C et de faire des aliquots concentrés ($500\mu\text{M}$) de $250\mu\text{L}$.

^{§§} <http://atchimiebiologie.free.fr/logicielslign/logicielslign.html>

VII.4. Surproduction et Purification de FUR d'*Helicobacter pylori*

La protéine HpFUR a été surproduite à partir de cellules BL21(DE3) fraîchement transformées avec le plasmide *pfur3*. Une pré-culture d'un transformant est faite sur la nuit à 37°C avant de diluer 100 fois la suspension bactérienne dans 1 L de LB contenant de l'Ampicilline à 150 µg/mL.

Les cellules poussent à 37°C sous agitation, à $DO_{600} = 0.7-0.8$, la surproduction est induite avec de l'IPTG à 0.5 mM final pendant 2h. Les cellules sont centrifugées à 6000g pendant 10 minutes à 6°C.

Le culot de cellules est resuspendu immédiatement dans 35 mL de 20 mM HEPES pH 7.4 contenant 500 mM NaCl, 10 µg/mL d'ICT, 4 µg/mL de Pepstatine A, 240 µg/mL de PMSF. La suspension est soniquée 5 fois pendant 30 secondes dans un bain de glace. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 20000g pendant 20 minutes. Approximativement 50% de la protéine reste dans le culot. Le surnageant de sonication, auquel a été ajouté 24 µg de DNase I, est dialysé à 2 reprises à 4°C contre 2 L de 20mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl et 3 mM de $MgSO_4$. A la fin de la seconde dialyse, 3mM EDTA est ajouté au dialysat. Ce dernier est centrifugé à 20000g pendant 20 minutes à 6°C.

L'extrait brut de protéine est chargé sur une colonne échangeuse de cations (SP Sepharose HP Hiload 16/10) équilibrée avec du tampon A (20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl) et 12% de tampon B (20 mM HEPES pH 7.4, 1 M NaCl). La colonne est lavée par 6 volumes du tampon d'équilibration. La protéine est éluée avec un gradient linéaire allant de 12 % de tampon B à 60 % de ce tampon à 2 ml/min sur 17 volumes de colonne. HpFUR est éluée entre 350 et 450 mM de NaCl.

La protéine « pré » purifiée est ensuite concentrée sur un ultrafree de 15 mL avec un cut-off de 5 kDa.

La dernière étape de purification consiste en une colonne de filtration sur gel (Superdex 75 prep grade (HR16/60)). La colonne est équilibrée avec du 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 400mM NaCl, 5 mM DTT. Le volume d'élution de la protéine est approximativement de 58 mL (dimère). La pureté de la protéine est vérifiée par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les fractions « pures » sont regroupées et concentrées sur un ultrafree de 4 mL. La protéine est stockée à -80°C avec 10% de glycérol.

La concentration en protéine est déterminée par un dosage en spectroscopie UV-Visible à 280 nm, le coefficient d'extinction molaire théorique est de $11460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Expasy).

Le rendement de purification est d'environ 8 mg de protéine pure soluble par litre de culture bactérienne. Ce rendement varie en fonction de l'efficacité de l'étape d'extraction (étape critique). Différents paramètres ont été testés dont le type de cellules surproductrices, la température d'induction, la composition du tampon d'extraction sans véritable succès.

La protéine HpFUR avant utilisation doit être décongelée rapidement à 37°C pendant quelques minutes, puis laisser au minimum 30 min à 4°C . La protéine doit ensuite être retraitée avec un réducteur. HpFUR est plus stable en présence de DTT (limite la formation de ponts dissulfures) et dans des tampons ayant un pH proche de la neutralité (pH7-7.4). Il est préférable de conserver la protéine à -80°C qu'à 4°C et de faire des aliquots concentrés ($500\mu\text{M}$) de $250\mu\text{L}$.

VII.5. Dosage colorimétrique des métaux avec du 4-(2-pyridylazo)resorcinol

La quantité de métal présente dans les différents lots de protéine purifiée a été déterminée par d'un dosage colorimétrique avec du 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) (Figure VII.2). Ce composé chélate les métaux de transition sous la forme d'un complexe 2:1 (McCall & Fierke, 2000).

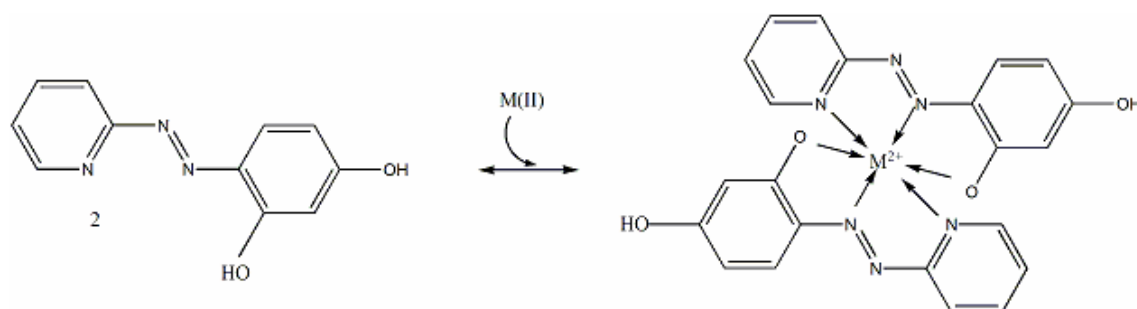


Figure VII.2 Structure du PAR et complexe de liaison 2 PAR:1 M^{2+} (McCall & Fierke, 2000)

Dans le cas des protéines NikR Ec ou Hp purifiées, ces dernières sont *a priori* sous la forme d'apo protéine : elles ne contiennent pas de métal ou seulement à l'état de traces. Une quantité minimale de $260 \mu\text{g}$ de protéine dans $130 \mu\text{L}$ doit être utilisée pour réaliser ce dosage pour mesurer des traces métalliques.

Dans le cas de HpFUR, elle contient *a priori* 1 équivalent de Zn par monomère dans le site structural (extrapolation des données sur FUR d'*Escherichia coli*). Une quantité allant de $9 \mu\text{g}$ à $40\mu\text{g}$ de protéine dans $130\mu\text{L}$ peut être utilisée pour ce dosage.

Afin d'être sûr que tout le métal soit accessible au PAR, un traitement des échantillons protéiques à l'acide trichloroacétique (TCA) s'avère nécessaire.

A l'échantillon de protéine est ajouté 10 % en concentration de TCA. L'échantillon de 130 μ l est incubé dans la glace pendant 30 minutes au cours desquelles la protéine est dénaturée et précipite. L'échantillon, alors, est centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm. 120 μ L du surnageant sont neutralisés avec du NaOH à 65 mM final et tamponnés avec du 500 mM Tris/HCl pH 8 final. La concentration en métal dans l'échantillon est déterminée en le faisant réagir avec du PAR à 100 μ M final préparé extemporanément, tamponné à pH 8 et filtré. Le mélange réactionnel de 600 μ L est incubé 1 heure à l'obscurité. Il est important de contrôler le pH à l'aide une bandelette de papier pH car l'intensité de l'absorption est pH-dépendante. Les changements dans les spectres UV/vis du PAR dus à la complexation des métaux sont comparés à des courbes de calibrations mesurées le jour même avec différents métaux de transition (Ni(II), Zn(II), Cu(II), Co(II)).

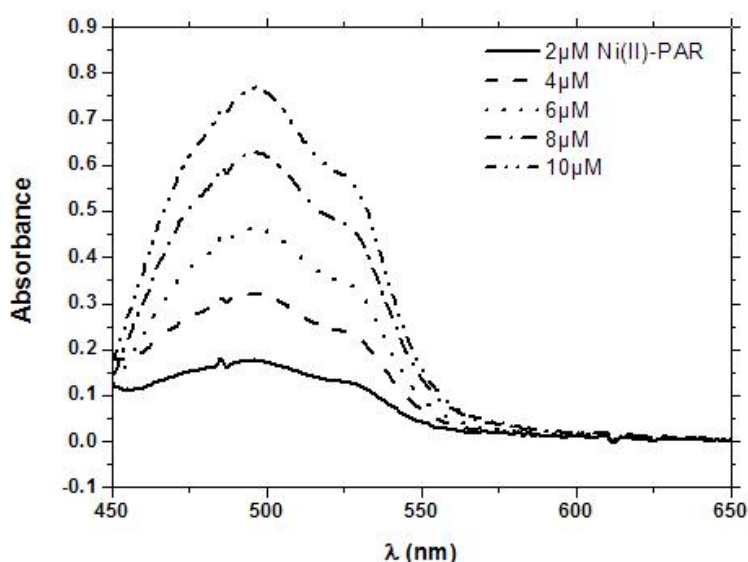


Figure VII.3 Spectres d'absorption dans le visible des complexes Ni(II)-PAR à pH 8

La dosage des métaux avec du PAR est une technique informative de la quantité de métal contenu dans un échantillon, mais elle ne permet pas de dissocier les métaux présents.

Moins de 5 % de métaux de transition ont été détectés dans les protéines NikR d'*E.coli* et d'*H.pylori* en sortie de purification.

Pour HpFUR, 0,6 à 0,7 équivalents de métal par monomère ont été mesurés en sortie de purification.

VII.6. Diffusion dynamique de la lumière

Des expériences de DLS ont été réalisées sur EcNikR WT en absence et en présence de Ni(II). Par cette technique, il est possible de mesurer l'homogénéité de l'échantillon et de déterminer de façon approximative la masse des espèces étudiées.

Les expériences ont été enregistrées sur un Zetasizer nano S de Malvern Instrument thermostaté à 20°C en utilisant une cuve en quartz de 50 µL.

L'échantillon protéique de 20 µM est dans du 20mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Des additions successives de Ni(II) sont faites sur l'échantillon : 0 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,075 ; 0,1 et 0,3 équivalent. Après chaque ajout métallique, l'échantillon est incubé pendant 20 minutes pour permettre l'équilibration. La mesure peut alors être faite.

VII.7. Spectrométrie d'absorption atomique

La quantité de zinc contenue dans HpFUR a été mesurée par spectrométrie d'absorption atomique en flamme Air-Acétylène (spectromètre Perkin Elmer 560 Norwalk) en utilisant un calibrage externe réalisé dans le tampon de la protéine (pour masquer les effets de matrice). Les analyses ont été faites par J. Arnaud du Département de Biologie Intégrée du CHU Grenoble. Au préalable de l'analyse, le tampon des échantillons protéiques a été échangé sur une NAP-5 (GE Healthcare). 100µL d'HpFUR concentrée à 450µM dans du 20mM Tris/HCl pH 7.4, 400mM NaCl sont dilués 5 fois avec du tampon 20mM Tris/HCl pH 7.4. Les 500µL sont ensuite déposés sur la colonne NAP-5 équilibrée avec du 20mM Tris/HCl pH 7.4. Un mL d'HpFUR éluée est récupéré. 500µL d'HpFUR à 30-50µM par sous unité dans le tampon 20mM Tris/HCl pH 7,4 sont nécessaires pour les analyses ainsi que du tampon seul pour la calibration externe (50mL). La présence de sel dans le tampon peut perturber l'analyse. La quantité de zinc attendue était de l'ordre de 70% de la concentration en protéine.

VII.8. Dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un spectrophotomètre JASCO J-810 à 25°C pour les expériences d'Ec et HpNikR. Par contre pour HpFUR, les expériences ont été réalisées sur un spectrophotomètre Chirascan d'Applied photophysics à 25°C. Le tampon utilisé pour les différentes mesures, 20 mM MOPS pH 7 40 mM KCl, contient peu de sels. En effet ces derniers diffusent vers les 190 nm. Ils perturbent l'enregistrement de spectres « propres ».

VII.8.1. Les conditions de mesures

Dans l'UV-lointain, les spectres ont été enregistrés entre 195-250 nm dans des cuves de 300 µL et de 1 mm de trajet optique.

Dans l'UV-proche, les spectres ont été enregistrés entre 250-320 nm dans des cuves de 2 mL et de 10 mm de trajet optique.

Les conditions de mesures sont les suivantes :

Sur le JASCO J-810 :

Bande passante : 4 nm ; Pas : 1 nm ; Vitesse : 100 nm/min ; Réponse du détecteur : 1 sec. 10 scans par expérience sont enregistrés et moyennés.

Sur le Chirascan :

Bande passante : 1 nm ; Pas : 1 nm ; Vitesse : 50 nm/min ; Réponse du détecteur : 1 sec. 4 scans par expérience sont enregistrés et moyennés.

Les spectres obtenus ont tous été normalisés afin de faire abstraction de la concentration en protéines utilisées, et du nombre de résidus de ces dernières (au préalable la contribution du tampon est soustraite $\theta_{\text{protéine}} - \theta_{\text{tampon}}^{***}$).

L'équation de normalisation est la suivante :

$$[\theta] = \frac{(\theta \times 0.1)}{([C] \times T \times Naa)} \quad (\text{Équation 1})$$

où $[\theta]$ correspond à l'ellipticité molaire par résidu en $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, θ correspond à l'ellipticité mesurée en mdeg, $[C]$ correspond à la concentration protéique par sous unité monomérique en M, T précise le trajet optique en cm et Naa correspond au nombre de résidus.

VII.8.2. Comparaison de HpNikR WT et de son mutant M1

Le tampon des protéines a été échangé par dilution puis concentration sur Ultrafree (Vivaspin 500 µL – 5kDa cut off, Vivascience) afin qu'elles soient dans du MOPS 20 mM pH 7 KCl 40 mM.

Seuls les spectres CD en UV-lointain et proche des protéines HpNikR WT et M1 apo à 10 et 15 µM respectivement ont été enregistrés. Les protéines concentrées ont été diluées dans du MOPS 20 mM pH7 KCl 40 mM.

Après 15 minutes d'équilibration les spectres sont enregistrés.

*** Les spectres équivalents du tampon contenant les mêmes quantités de métal ont été enregistrés afin de soustraire la contribution des sels à l'ellipticité des échantillons protéiques.

VII.8.3. Titration en Ni(II) de EcNikR WT et de son mutant 3HA

Le tampon des protéines est échangé en utilisant une NAP-5 ; EcNikR WT, dans le tampon MOPS 20 mM pH7 KCl 40 mM, tend à s'oligomériser si elle est laissée dans un bain de glace. Par contre elle est stable à température ambiante.

La titration métallique est faite sur un échantillon de protéine sur lequel des ajouts successifs de Ni(II) sont faits. Ces titrations ont été suivies en UV-lointain puis en UV-proche afin de mesurer l'effet du Ni(II) sur la structure secondaire et tertiaire des protéines.

EcNikR concentrée est diluée dans du tampon MOPS 20mM pH7 KCl 40 mM afin d'obtenir une concentration de 15 μ M. Après 15 minutes d'équilibration, le spectre est enregistré. L'ajout de Ni(II) est réalisé dans un tube Eppendorf dans lequel est ajoutée la solution de protéine à 15 μ M utilisée pour le spectre initial. Cette technique a été utilisée afin de limiter l'agrégation de la protéine en présence d'une concentration excessive en métal, de limiter la perte de protéine et les erreurs de pipetage. Après 15 minutes d'équilibration, le spectre est enregistré. Une nouvelle addition de Ni(II) est ensuite réalisée sur cet échantillon métallé. Les différents ajouts de Ni(II) par unité monomérique de protéine suivants ont été réalisés : 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,5eq.

VII.8.4. Titration métallique HpFUR

La titration métallique est faite sur un échantillon de protéine sur lequel des ajouts successifs en métal sont faits. Ces titrations ont été suivies en UV-lointain afin de mesurer l'effet des métaux sur la structure secondaire d'HpFUR protéines.

HpFUR concentrée dans du tampon MOPS 20mM pH7 KCl 400 mM est diluée dans du tampon MOPS 20mM pH7 KCl 20 ou 30 mM (selon l'échantillon protéique) afin d'obtenir une concentration de 10 μ M pour HpFUR et une salinité proche de 40mM pour le KCl. Après 20 minutes d'équilibration, le spectre est enregistré. L'ajout de métal est réalisé dans un tube Eppendorf dans lequel est ajoutée la solution de protéine à 10 μ M utilisée pour le spectre initial. Après 15 minutes d'équilibration, le spectre est enregistré. Une nouvelle addition de métal est ensuite réalisée sur cet échantillon métallé. Les différents ajouts métalliques par unité monomérique de protéine suivants ont été réalisés : 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15eq.

VII.9. Suivi de la métallation par spectroscopie UV-Visible

La liaison de métaux tels que le nickel (NiCl_2 ou NiSO_4), le cobalt (CoSO_4), ou le cuivre (CuSO_4) ou le manganèse (MnCl_2) par NikR d'*Escherichia coli* et NikR et FUR d'*Helicobacter pylori* a été suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible. Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre à barrette de diode HP 8453 thermostaté à 20°C. Les mesures des spectres ont été réalisées dans des cuves en quartz de 70 et 180 μL (trajet optique 1cm), en utilisant 100 et 200 μL de solution protéique allant de 40 à 450 μM . L'addition du métal se fait dans un tube Eppendorf propre dans lequel est ajouté, dans un second temps, la solution protéique. Après quelques minutes d'équilibration, un premier spectre de référence est enregistré. Deux nouveaux spectres sont enregistrés 10 et 20 minutes après afin de vérifier la stabilité du système.

Les expériences de métallation sont réalisées principalement dans du 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, à l'exception des mesures faites lors de l'étude en dépendance du pH où le tampon utilisé est du 50 mM acétate de sodium (pH allant de 6 à 4.5) 1 M NaCl (Fauquant *et al.*, 2006). Les expériences de métallation pour HpFUR ont été réalisées dans 20 mM HEPES pH 7.4, 1 M ou 500 mM NaCl.

Le tampon des solutions protéiques est échangé soit sur NAP-5 (GE Healthcare), soit sur des Micro Bio-Spin® 6 (Biorad). Pour l'étude en pH, des solutions protéiques concentrées ont été diluées 10 fois dans le tampon étudié. L'équilibration du système est faite sur la nuit à 4°C.

La détermination des coefficients d'extinction molaire apparents des bandes d-d et des bandes de transfert de charge est faite en appliquant un modèle de régression linéaire dans le domaine de linéarité observé. La soustraction du spectre de la protéine apo est faite sur chaque mesure spectrale.

VII.10. Liaison sur filtre : Liaison du ^{63}Ni par EcNikR

La technique de liaison sur filtre (Blokesch *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1994) a permis de déterminer la stoechiométrie de liaison du nickel par EcNikR (Fauquant *et al.*, 2006). La quantité totale de ^{63}Ni liée a été mesurée et ce indépendamment de l'agrégation. Par ailleurs, une mesure de l'affinité de EcNikR pour ce métal de transition a été faite avec cette technique (Diederix *et al.*, soumis à publication). L'ensemble des expériences a été réalisé au laboratoire de Microbiologie-Adaptation-Pathogénie de l'UCB Lyon I.

La source radioactive de $^{63}\text{NiCl}_2$ à 396 nCi.nmol⁻¹ provient de GE Healthcare.

Les mesures de liaison sur filtre ont été faites sur des échantillons de EcNikR sauvage, de mutant Q2E et de mutant H4. EcNikR WT et Q2E se métallent de façon identique.

Pour déterminer la stoechiométrie de liaison, des échantillons de 300 μL contenant 4.5 μM de EcNikR sont incubés avec des quantités croissantes de $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ dans du 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl pendant 45 minutes à température ambiante. Pour mesurer l'affinité, des échantillons contenant 100, 200 et 400 nM de protéines ont été utilisés. Pendant le temps d'incubation, la membrane de PVDF (Sequiblot PVDF membranes, 0.2 μM , Biorad) est équilibrée ; un premier bain dit de "mouillage" de quelques secondes dans du méthanol est réalisé. Un second bain de lavage de 2 minutes dans de l'eau est effectué avant de passer au bain d'équilibration dans le tampon réactionnel. L'équilibration est complète lorsque la membrane flotte. La membrane ne doit pas être sèche au moment du dépôt des échantillons.

La membrane est montée sur le système Bio-Dot[®] microfiltration (BioRad) de 96 puits (Figure VII.4) afin de réaliser plusieurs conditions expérimentales simultanément à la différence de système classique.

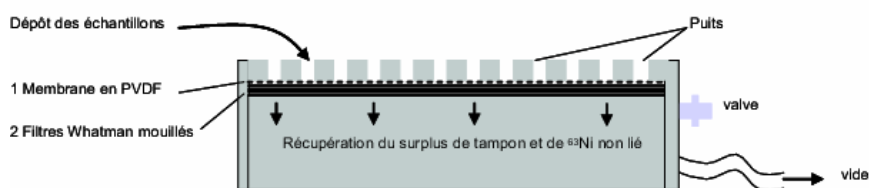


Figure VII.4 Système Bio-Dot[®] microfiltration de BioRad

Des aliquots de 50 μL (3 dépôts/échantillon) sont déposés dans chaque puits, après quoi le tampon et le $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ non lié sont filtrés. La membrane est ensuite lavée 8 fois avec du tampon.

La quantité totale "vraie" de $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ mise par échantillon est déterminée en la mesurant sur 2 aliquots de 50 μL . L'échantillon "liquide" réagit spécifiquement avec le produit de scintillation "PCS" (GE Healthcare). La quantité de $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ liée à EcNikR est déterminée par scintillation en faisant réagir l'OCS (GE Healthcare) sur le filtre (le fond de chaque puits est découpé).

La quantité de $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ liée à la protéine, après incubation de cette dernière pendant 20 minutes avec un excès d'EDTA, est déterminée de la même façon.

La liaison non spécifique du $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ (en absence de protéine) à la membrane a été déterminée de la même manière que précédemment.

Moins de 3 % du nickel total sont retenus, cette quantité peut être négligée.

Les données de liaison sur filtre ont été analysées en utilisant le logiciel DynaFit (Kuzmic, 1996).

VII.11. Spectroscopie de Fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été faites sur un fluorimètre Perkin-Elmer LS50B thermostaté à 25°C.

VII.11.1. Fluorescence des tryptophanes

L'étude de la fluorescence des tryptophanes permet de suivre les changements conformationnels que peut subir une protéine sous certaines conditions. En effet l'exposition des tryptophanes au solvant polaire ou non, modifie leur longueur d'onde d'émission maximale. Elle varie de 310 nm pour un tryptophane enfoui à 350nm pour un tryptophane exposé au solvant (Reshetnyak *et al.*, 2001). HpNikR et HpFUR ont un tryptophane par unité monomérique. L'effet des métaux sur les changements conformationnels peut donc être suivi par cette méthode.

VII.11.1.1. *Les conditions de mesures*

Les expériences portant sur la fluorescence des tryptophanes ont été réalisées dans du MOPS 20 mM pH7 KCl 150mM filtré sur du 0.22µM.

Les conditions de mesures sont les suivantes :

$\lambda_{\text{excitation}}$: 295 nm ; Filtre cut-off: 290 nm ; bande passante d'excitation : 5 nm ; bande passante d'émission : 20 nm ; 4 spectres d'émission sont enregistrés entre 290 nm et 500 nm puis sont moyennés.

Les cuves en quartz utilisées ont une contenance minimale de 2 mL, le trajet optique est de 1 cm et les 4 surfaces sont transparentes.

VII.11.1.2. *Titration métallique sur HpNikR WT, M1 et HpFUR*

Les effets de différents métaux (Ni(II), Co(II), Mn(II), Cu(II) et Zn(II)) sur la fluorescence du tryptophane d'HpNikR WT, de son mutant M1 et d'HpFUR ont été mesurés à pH 7 et à pH 6. Plusieurs concentrations de protéines ont été testées : 1,5 ; 3 ; 3,6 et 5 µM. Des ajouts successifs de métal ont été faits directement dans la cuve. Après 10 minutes d'équilibration, les spectres d'émission sont enregistrés.

Le spectre du tampon est enregistré afin de soustraire sa contribution au spectre d'émission des tryptophanes des protéines apo.

VII.11.2. Fluorescence du 8-anilino-1-naphtalène sulfonate (ANS)

L'ANS est une sonde fluorescente fréquemment utilisée afin d'étudier les changements structuraux des protéines (au niveau tertiaire et quaternaire). L'ANS est une molécule plane qui possède une fluorescence intrinsèque liée au groupement naphtalène (Figure VII.5A).

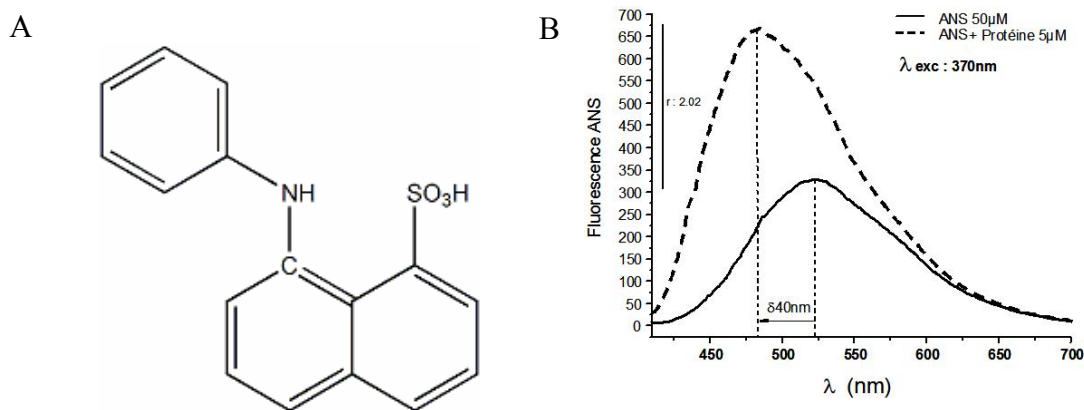


Figure VII.5 A) Molécule plane d'ANS. B) Spectres d'émission de l'ANS seul et en présence de protéine après excitation à 370nm.

Lorsqu'elle est mise en présence de protéine, elle se lie aux régions hydrophobes exposées (Stryer, 1965; Uversky *et al.*, 1998). Cette liaison entraîne une modification de la fluorescence moyenne de l'ANS. Sur un spectre d'émission, cette liaison est identifiable au travers d'un déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de l'ANS ainsi que d'une augmentation de l'intensité (Figure VII.5B).

VII.11.2.1. Les conditions de mesure

Les expériences portant sur la fluorescence de l'ANS ont été réalisées dans du 20 mM MOPS pH7 150mM KCl filtré sur du 0.22 μM .

Les conditions de mesures sont les suivantes :

$\lambda_{\text{excitation}}$: 370 nm ; Filtre cut-off: 390 nm ; bande passante d'excitation : 5 nm ; bande passante d'émission : 20 nm ; 4 spectres d'émission sont enregistrés entre 400 nm et 700 nm puis sont moyennés.

Les cuves en quartz utilisées ont une contenance minimale de 2 mL, le trajet optique est de 1 cm et les 4 surfaces sont transparentes.

VII.11.2.2. Comparaison des protéines *HpNikR* WT et de son mutant *M1*

Les changements structuraux moyens engendrés par les métaux sur la protéine vont être suivis en mesurant l'émission de fluorescence moyenne de l'ANS lié aux zones hydrophobes de la protéine.

Une solution d'ANS à 1mM dans du 20 mM MOPS pH 7 150 mM KCl doit être préparée la veille des expériences. La dissolution de l'ANS est lente. Cette solution doit être protégée de la lumière et filtrée par la suite.

Les expériences sont faites en présence de 50 μ M d'ANS. Après avoir enregistré le spectre d'émission de l'ANS seul, 3 μ M de protéine lui sont ajoutés. Le système incube pendant 10 minutes à 25°C, sous agitation et dans l'obscurité avant que ne soit enregistré le spectre d'émission de l'ANS en présence de protéine. Des ajouts successifs de métal sont alors réalisés. Entre chaque ajout métallique, une incubation de 10 minutes est effectuée puis le spectre moyen est enregistré.

VII.11.3. L'anisotropie de fluorescence

VII.11.3.1. Principe de la technique

Il est possible de suivre la liaison d'une protéine sur une séquence oligonucléotidique marquée avec une sonde fluorescente en suivant l'anisotropie de fluorescence de cette sonde.

L'anisotropie de fluorescence consiste à exciter le fluorophore par des photons polarisés à une longueur d'onde donnée $h\nu_1$. Après quoi, le fluorophore, pour retourner à l'équilibre, va émettre des photons à une longueur d'onde $h\nu_2$ (Figure VII.6).

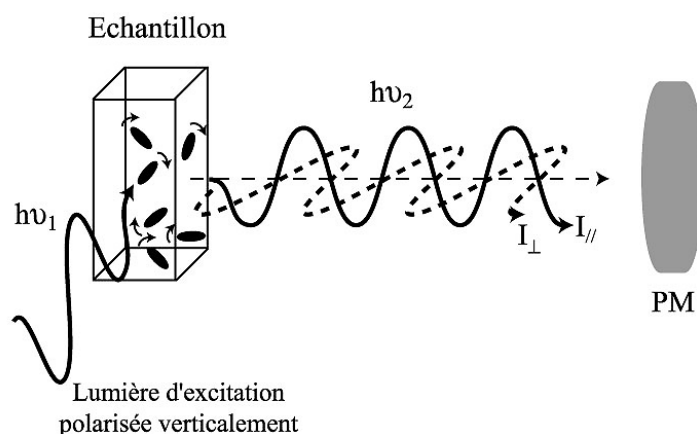


Figure VII.6 Principe de l'anisotropie de fluorescence (PM : photomultiplicateur)

Les photons émis auront une polarisation différente du faisceau de photons incidents du fait de la rotation de la molécule. L'anisotropie de fluorescence « r » peut être déterminée à partir de la relation suivante :

$$r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}}$$

Le facteur de correction G permet de tenir compte des imperfections de l'appareil qui n'a pas la même sensibilité selon la direction de la polarisation mesurée. $I_{//}$ et I_{\perp} correspondent aux intensités de fluorescence mesurées parallèlement et perpendiculairement au faisceau incident polarisé.

L'anisotropie de fluorescence est sensible à la rotation de la molécule, elle augmente proportionnellement avec le temps de corrélation τ_c de la molécule fluorescente comme le montre l'équation de Perrin :

$$r = \frac{r_0}{1 + t/\tau_c} \text{ où } r_0 \text{ correspond à l'anisotropie limite du système (dans notre cas } r_0 \text{ est de 0,2) et } t$$

correspond au temps de demie vie du fluorophore,.

Le temps de corrélation, τ_c , de la sonde est dépendant de la viscosité, de la température et du volume de la molécule (assimilé souvent au poids moléculaire). Il suit la loi de Stokes-Einstein. Plus le temps de corrélation de la sonde est long (traduisant une rotation plus lente de la sonde du fait d'une augmentation de volume et/ou de masse de la molécule) plus l'anisotropie augmente. La formation d'un complexe Fl-ADN-Protéine se traduit donc par une augmentation de l'anisotropie.

Le choix de la sonde est très important car la durée de demi-vie t du fluorophore influence directement le signal observé. Pour voir un effet lors de la formation d'un complexe, la durée de demi-vie doit être de l'ordre du temps de corrélation du complexe observé.

Le fluorophore que nous avons choisi d'utiliser est la fluorescéine dont la durée de demi-vie est de 4ns. Ce fluorophore est classiquement utilisé pour des mesures en anisotropie de fluorescence de la liaison de métallorégulateurs sur leurs séquences opératrices (Pecqueur, 2005; Wang *et al.*, 2005).

VII.11.3.2. Les conditions de mesures

Les expériences portant sur la fluorescence de l'ANS ont été réalisées dans du 20 mM MOPS pH7 150mM KCl filtré sur du 0.22 μ M.

Les conditions de mesures sont les suivantes :

$\lambda_{\text{excitation}}$: 494 nm ; Filtre cut-off: 515 nm ; bande passante d'excitation : 5 nm ; bande passante d'émission : 20 nm ; Le temps d'intégration est de 1 sec ; L'anisotropie est mesurée pendant 5 minutes. Le système est sous agitation pour faciliter l'équilibration du système.

Il faut veiller à ce que la fluorescence du fluorophore ne varie pas de plus de 10% au cours de l'expérience. Il faut également contrôler si la variation d'anisotropie n'est pas dépendante d'une fluctuation de la fluorescence du fluorophore [$\lambda_{\text{excitation}}$: 494 nm et $\lambda_{\text{émission}}$: 527 nm]. L'anisotropie de départ est dépendante des conditions de tampon (pH, sels).

La liaison d'Ec et d'HpNikR à l'ADN a été mesurée sur 2 duplex oligonucléotidiques présentant en 5' la fluorescéine :

- *pnikA*-Fl:

```
5'  F1-ACAGGTAATCAGTATGACGAATACTTAAAATCGTCATACTTATTTTC  3'
3'          TCCATTAGTCATACTGCTTATGAATTTTAGCAGTATGAATAAAGGC  5'
```

- *pureA*-Fl:

```
5'  F1-GCAAAGATATATAACACTAATTCATTTTAAAATAATAATTAGG  3'
3'          CGTTTCTATATTGTGATTAAGTAAAATTTATTATTAAATCC  5'
```

VII.11.3.3. Liaison d'EcNikR WT et de son mutant Q2E

La liaison d'EcNikR WT et Q2E sur le duplex *pnikA*-Fl a été suivie lors de titrations par le Ni(II), la liaison totale et la liaison spécifique ont été mesurées. L'anisotropie initiale de *pnikA*-Fl à 10nM dans le tampon 20mM MOPS pH7, 150mM KCl, 12mM MgCl₂ en présence ou non de poly dIdC à 10μg/mL (liaison spécifique ou totale) est mesurée. 2,5μM de protéine sont ensuite ajoutés dans la cuve. Après 10 minutes d'incubation, l'anisotropie est enregistrée. Si cette dernière fluctue beaucoup ($\Delta 0.02$), cela signifie que le système n'est pas à l'équilibre. L'équilibration doit être prolongée pendant une dizaine de minutes en général. Pendant la période d'incubation la cuve est maintenue à l'obscurité.

Des ajouts successifs de Ni(II) sont alors réalisés dans la cuve. Entre chaque ajout métallique, une incubation de 10 minutes est effectuée puis l'anisotropie est enregistrée.

VII.11.3.4. Liaison d'HpNikR à *pureA*

La liaison d'HpNikR WT sur le duplex *pureA*-Fl a été suivie lors de titration protéique ainsi que lors de titration par le Ni(II), la liaison totale et la liaison spécifique ont été mesurées.

- Titration protéique

Deux tampons réactionnels ont été testés afin de mesurer la liaison d'HpNikR à *pureA*-F. 20nM de duplex ont été mis dans du 20mM MOPS pH7, 150mM KCl, 100μM NiCl₂ ou dans

du 20mM BisTris/Borate, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2,5% Glycérol, 0,1% Triton, 100μM NiCl₂. Des ajouts successifs de protéine sont réalisés. Entre chaque ajout, une incubation de 10 minutes est effectuée puis l'anisotropie est enregistrée. L'ajout de poly dIdC à 10μg/mL en fin d'expérience permet de s'assurer de la spécificité de la liaison d'HpNikR à *pureA-F*.

- Titration par le Ni(II)

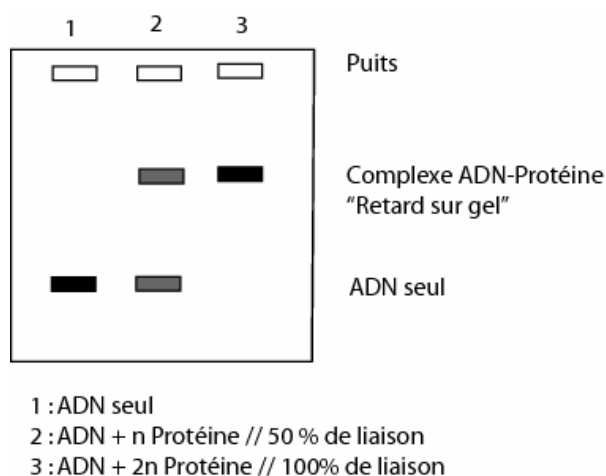
20nM de duplex ont été mis dans du 20mM MOPS pH7, 150mM KCl. L'anisotropie initiale de *pureA-FI* est mesurée avant l'ajout des 2,5μM d'HpNikR WT. L'anisotropie mesurée ne diffère pas de l'anisotropie mesurée en absence de protéine. Des ajouts successifs de nickels sont réalisés. Entre chaque ajout, une incubation de 10 minutes est effectuée puis l'anisotropie est enregistrée.

VII.12. Retard sur gel ou EMSA

L'étude de la liaison à l'ADN d'Ec et HpNikR a été faite en utilisant tout d'abord des duplex oligonucléotidiques marqués sur une extrémité 5' à la fluorescéine puis des duplex oligonucléotidiques marqués en 5' avec du ³²P. La première étude a permis de tester l'efficacité des oligonucléotides choisis ainsi que de déterminer la stoechiométrie des complexes ADN/Protéine. La seconde étude a été réalisée afin de déterminer les constantes de dissociation des protéines pour l'ADN. Le principe des techniques est brièvement présenté.

VII.12.1. Principe de l'EMSA

La technique du retard sur gel permet d'étudier la liaison de complexes protéiques à l'ADN en conditions natives. La migration d'un duplex oligonucléotidique seul est comparée à celle du duplex lié par une protéine ([Figure VII.7](#)). Le complexe ADN-Protéine étant plus « lourd », la migration sur gel de polyacrylamide de ce dernier est retardée par rapport à celui d'un ADN seul.



Cette technique permet de mesurer l'affinité d'une protéine pour une séquence d'ADN donnée. Il est aussi possible de déterminer la stoechiométrie du complexe en couplant l'EMSA à l'analyse du Ferguson.

Figure VII.7 Principe du retard sur gel d'un complexe ADN/protéine par rapport à l'ADN seul. L'affinité de la protéine pour l'ADN peut être déterminée lorsque 50% de l'ADN sont complexés et donc retardés.

VII.12.2. Principe de l'analyse de Ferguson

L'analyse des retards sur gel par la méthode de Ferguson (Ferguson, 1964; Orchard & May, 1993), permet de déterminer le poids moléculaire apparent de macromolécules en conditions natives. Cette technique consiste à faire migrer dans des gels natifs à différents pourcentages d'acrylamide des protéines ou des complexes (Protéine:ADN) afin d'en déduire leur poids.

L'utilisation de gels contenant différents pourcentages d'acrylamide (6 à 10%) couplée à l'utilisation de marqueurs protéiques natifs de poids moléculaire connus permet de s'affranchir des problèmes de charge et de forme de la protéine. Pour chaque marqueur protéique et pour chaque échantillon à étudier, des jeux de gels sont réalisés afin de déterminer le déplacement de l'échantillon dans le gel en fonction du pourcentage d'acrylamide.

Pour s'affranchir des différences de temps de migration, ce paramètre est mesuré en calculant le rapport frontal vrai RF. Ce dernier correspond au rapport entre le rapport frontal de l'échantillon (distance parcourue par l'échantillon / taille du gel) et le rapport frontal du tampon (distance parcourue par le bleu de bromophénol / taille du gel). La régression linéaire des RF en fonction du pourcentage du gel permet d'obtenir une pente caractéristique de la taille de la molécule (Figure VII.8A). La représentation graphique de ces pentes en fonction du poids moléculaire pour des marqueurs protéiques de poids moléculaire connu permet d'obtenir une courbe de calibration et de déterminer *in fine* le poids apparent des complexes Protéine:ADN observés sur gel (Figure VII.8B) pour lesquels la pente a au préalable été calculée.

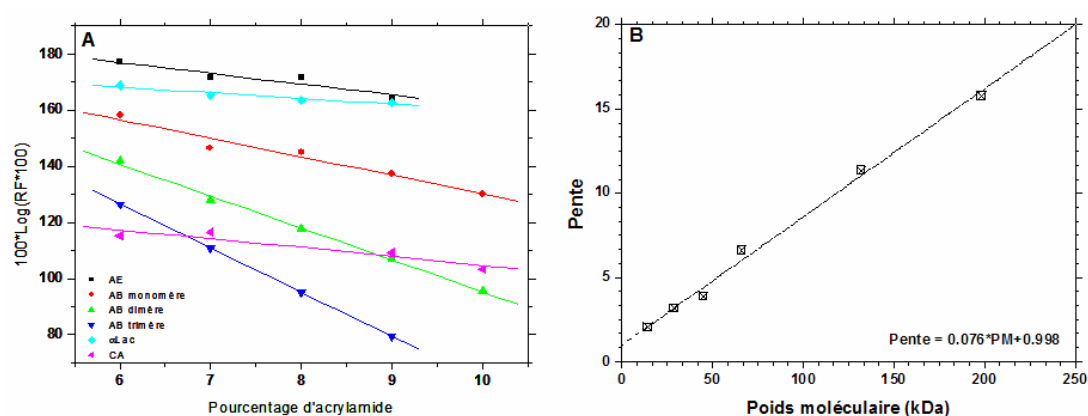


Figure VII.8 A) Représentation graphique de l'évolution du RF des marqueurs protéiques en fonction du pourcentage d'acrylamide. AE : Albumine de l'œuf, AB : Albumine bovine, α lac : α lactalbumine, CA : Anhydrase carbonique. B) Représentation graphique de la pente caractéristique en fonction du poids moléculaire des marqueurs protéiques, détermination de l'équation permettant de calculer le poids moléculaire des complexes à analyser.

VII.12.3. Retard sur Gel : Fluorescence

VII.12.3.1. Les duplex oligonucléotidiques

Les oligonucléotides froids et marqués à la fluorescéine en 5' ont été achetés chez Sigma Genosys.

Chaque oligonucléotide lyophilisé est dissous dans de l'eau milliQ pour obtenir une concentration finale de 200 μ M. L'oligonucléotide marqué à la fluorescéine est protégé de la lumière. La concentration de chaque brin est vérifiée par mesure de l'absorption à 260 nm de la solution. Les deux brins complémentaires sont ensuite mélangés avec un rapport 1 : 1 à une concentration de 10 μ M dans du 20 mM Tris/HCl pH 8 300 mM NaCl. Le mélange est chauffé à 95°C pendant 30 minutes. La température est ensuite graduellement baissée de 95 à 37°C par pas de 10°C toutes les 30 minutes. Lorsque la température est de 37°C, le mélange est incubé 2 heures avant d'être placé pendant une nuit à 4°C. L'efficacité de l'hybridation est vérifiée sur une colonne de filtration sur gel. Moins de 10 % de monobrin sont obtenus. La concentration du duplex est revérifiée par dosage de l'absorption à 260 nm. La solution est conservée à -20°C.

La liaison sur 5 duplex différents a été étudiée, une étude portant sur la liaison d'EcNikR sur l'ADN (*pnikA*) et les 4 autres portant sur la liaison d'HpNikR sur l'ADN.

Les duplex utilisés sont les suivants :

- *pnikA* (46pb)

```
5' F1-ACAGGTAATCAGTATGACGAATACTTAAAATCGTCATACTTATTTTC 3'
3' TCCATTAGTCATACTGCTTATGAATTTTAGCAGTATGAATAAAGGC 5'
```

- *pureA* (40pb)

```
F1-5' GCAAAGATAAACACTAATTCATTTTAAATAATAATTAGG 3'
3' CGTTTCTATATTGTGATTAAGTAAAATTTATTATTAATCC 5'
```

- *pnixA* (43pb)

```
F1-5' GGCAAATATATTACAATTACCAAAAAGTATTATTTTCTGG 3'
3' CCGTTTTATATAATGTTAATGGTTTTTCATAATAAAAAGACC 5'
```

- *pnifu* (47pb)

```
F1-5' CCTTTAAATCCAGTTTGTAATTATAATTGTTTCAATTTTAAATTAATTCC 3'
3' GGAAATTTAGGTCAAACATAATATTAACAAGTAAAATTTAATTAAGG 5'
```

- *pnikRS2* (44pb)

```
F1-5' GGTATTGACTTGTATTATTAAAACAATATAATCAACAACCCG 3'
3' CCATAACTGAACAATAAATTTTGTTATTATTAGTTGTTTGGCC 5'
```

Les bases soulignées ne sont pas spécifiques ; en gras sont précisés les domaines de liaison *a priori* (Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2006).

VII.12.3.2. Liaison d'*EcNikR* sur *pnikA*

Ces expériences d'EMSA ont été réalisées afin de déterminer la stoechiométrie de complexe ADN/Protéine.

Le volume réactionnel est de 10 µL. L'ordre des ajouts du matériel biologique est important. 0 µM à 30 µM de *EcNikR* sont mis en présence de 100 nM de *pnikA*-Fl, 100µg/mL de dIdC y sont ensuite ajoutés. La complexation débute après ajout du tampon 20 mM BisTrisBorate pH7.4, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 µM NiCl₂. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, 3 µL de solution de charge (20 mM BisTrisBorate pH 7.4, 3mM MgCl₂, 10µM NiCl₂, 32% glycérol, 0.02% en bleu de bromophénol) sont ajoutés. Pendant les temps de préparation des échantillons, un pré-run des gels est fait afin d'équilibrer le système (gel et tampon).

10 µL de l'échantillon sont déposés sur un gel d'électrophorèse en polyacrylamide contenant 10 µM de NiCl₂ (les pourcentages d'acrylamide testés vont de 6 à 10%). En parallèle des marqueurs protéiques de poids connu sont déposés. Une calibration des variations de déplacement des complexes en fonction du pourcentage du gel est alors possible ; ces variations sont reliées au poids apparent des complexes.

Le gel migre en chambre froide (4°C), à l'obscurité avec un voltage imposé de 134 V dans du BisTris/HCl Borate 20 mM pH 7.4, NiCl₂ 10µM.

Après migration, une photo du gel (Gel Doc 2000 Biorad) est prise afin de connaître le niveau de migration du bleu de bromophénol (BBP). Dans un second temps, une photo au fluorimager du gel est réalisée afin de visualiser l'ADN fluorescent libre et lié. Enfin le gel est coloré au bleu de coomassie, afin de mettre en évidence les marqueurs protéiques déposés. Une troisième photo est réalisée afin de connaître leur niveau de migration.

VII.12.3.3. Liaison d'*HpNikR* sur *pureA*, *pnixA*, *pNiFu* et *pnikRS2*

Ces expériences d'EMSA ont été réalisées afin de vérifier si *HpNikR* se lie sur les séquences d'ADN choisies pour nos études et les essais cristallographiques.

La réaction de complexation a lieu dans un volume réactionnel de 10 µL. L'ordre des ajouts du matériel biologique est important. 0 µM à 100 µM de *HpNikR* sont mis en présence de 100 nM de promoteur-Fl. La complexation débute après ajout du tampon 20 mM BisTrisBorate pH7.4, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 2,5% Glycérol, 100 µM NiCl₂. Après 20 minutes

d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, 3 µL de solution de charge (20 mM BisTrisBorate pH 7.4, 3mM MgCl₂, 32% glycérol,) sont ajoutés.

10 µL de l'échantillon sont déposés sur un gel d'électrophorèse à 7 % de polyacrylamide contenant 100 µM de NiCl₂. En parallèle des marqueurs protéiques de poids connu sont déposés. Le gel migre en chambre froide, à l'obscurité avec un voltage imposé de 134 V dans du 20 mM BisTrisBorate pH 7.4, 100µM NiCl₂.

Après migration, les différentes photos de gel sont prises afin de déterminer le rapport frontal vrai et de calculer les pentes et *in fine* le poids moléculaire apparent des complexes.

VII.12.4. Retard sur gel : Radioactivité

VII.12.4.1. Marquage des duplex oligonucléotidiques

Les duplex oligonucléotidiques froids sont préparés comme en VII.12.3.1. Une picomole des duplex est marquée avec de l'ATP-γ³²P dans un volume réactionnel de 30 µL.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- 1 µL de duplex à 1µM
- 6 µL de Tampon 5x "forward reaction" (350 mM Tris/HCl pH7.6, 50mM MgCl₂, 500 mM KCl, 5mM 2-mercapthoethanol) (Invitrogen)
- 21 µL d'eau mQ
- 1 µL d'ATP-γ³²P (Amersham Bioscience)
- 1 µL de T4 Polynucleotide Kinase (Invitrogen)

Après homogénéisation, l'échantillon est incubé pendant 30 minutes à 37°C. L'ATP-γ³²P libre est séparé du duplex chaud par échange sur une µbiospin G25 (GE Healthcare). La concentration théorique du duplex marqué est de 33 nM. Le duplex est conservé à 4°C pendant 2 semaines.

VII.12.4.2. Liaison à l'ADN d'HpNikR

La liaison d'HpNikR sur différentes séquences d'ADN a été testée en gel retard afin de déterminer l'affinité du complexe HpNikR-métal pour ces duplex.

La liaison sur les duplex suivants a été testée :

- *pnikR box* (43pb) (boîte prédite de liaison)

```
5' CATACTAGCATGAGCGGCTTTTAAACGAACTCATGCCAAAAAAG 3'
3' GTATGATCGTACTCGCCGAAATTGCTTGAGTACGTTTTTTC 5'
```

- *pureA* (40 et 32 pb)

5' GCAAAGATATA**TAACACT**AAATTCATTTTAAATAATAATTAGG 3'
3' CGTTTCTATATTGTGATTAAGTAAAATTTATTATTAATCC 5'

5' ATATA**TAACACT**AAATTCATTTTAAATAATAATTA 3'
3' TATATTGTGATTAAGTAAAATTTATTATTAAT 5'

- *pnixA* (43, 34 et 32 pb)

5' GGCAAAATATAT**TACAATT**ACCAAAAAAGT**ATTATTTT**CTGG 3'
3' CCGTTTTATATAATGTTAATGGTTTTTTCATAATAAAAAGACC 5'

5' ATATAT**TACAATT**ACCAAAAAAGT**ATTATTTT** 3'
3' TATATAATGTTAATGGTTTTTTCATAATAAAA 5'

- *pnifu* (47pb)

F1-5' CCTTTAAATCCAGTTTG**TATTATA**ATTGTTCAATTT**TAAATTA**ATTCC 3'
3' GGAAATTTAGGT**CAACATA**ATATTAACAA**GTA**AAATTTAATTAAGG 5'

- *pnikRS2* (44pb)

F1-5' GGTATTGACTTGT**TATTATT**AAAACAATATA**ATCAACA**AACCGG 3'
3' CCATAACTGA**ACAATA**TAATTTTGTAT**TATTAGT**TGTTTGGCC 5'

Les bases soulignées ne sont pas spécifiques et ont été ajoutées pour stabiliser le duplex, en gras sont précisés les domaines de liaison *a priori* (Contreras *et al.*, 2003; Delany *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2006).

Les conditions de complexation sont les suivantes :

- 3 µL de protéine à « x » nM
- 3 µL Eau mQ
- 3 µL de duplex chaud à 2.5 nM ou 1.25 nM
- 3 µL dIdC à 7.5 ou 15 µg/ml (ADN compétiteur)
- 3 µL de tampon de complexation 5X (100 mM BisTrisBorate pH7.4, 250 mM KCl, 15mM MgCl₂, 12.5% Glycérol, 0.5% Triton, 500µM Métal)

L'échantillon est incubé pendant 20 minutes à température ambiante, après quoi 3 µL de solution de charge à 40% en sucre, 3mM MgCl₂ et 0.02% en bleu de bromophénol sont ajoutés.

Pendant les temps de préparation des échantillons, un pré-run des gels est fait afin d'équilibrer le système (gel et tampon).

10 µL de l'échantillon sont déposés sur un gel d'électrophorèse à 8% en acrylamide. Le gel contient ou non du métal à 100µM selon les conditions. Le gel migre à température ambiante à un voltage imposé de 200 V dans du tampon BisTrisBorate 100 mM pH 7.4 comprenant ou non du métal. Les gels sont ensuite mis en cassette sur un film.

Deux heures après, une photo du film peut être faite en utilisant un phosphorimager (Molecular Imager FXTM Pro Plus, Biorad). La quantification de liaison est faite par mesure de la densitométrie en utilisant un GelDoc (Biorad).

VII.13. Test de protection à la nucléase

VII.13.1. Principe

Le test à la nucléase permet de tester l'activité de liaison à l'ADN des protéines ; c'est-à-dire : tester la capacité des protéines purifiées NikR ou FUR métallées ou non à se lier ou non à l'ADN.

Ce test nécessite un plasmide dans lequel a été insérée la séquence d'ADN que FUR ou NikR sont supposées lier. Cette séquence peut présenter naturellement un site de coupure à une enzyme de restriction. Dans le cas contraire un site doit être artificiellement créé en considérant les sites préexistants sur le plasmide.

Selon les conditions testées, si la protéine ne lie pas à sa séquence, l'enzyme choisie va couper le plasmide à ses différents sites : natif(s) et artificiel.

A l'inverse si la protéine est active et se lie à sa séquence d'ADN, l'enzyme ne pourra plus couper le plasmide au site créé.

Un plasmide a été créé afin de tester la réactivité de EcNikR (pP342 : construction d'A. Rodrigue) et un second plasmide a été créé au cours de ce travail afin de tester la réactivité de HpNikR et de HpFUR (pHP2S).

VII.13.2. Plasmide EcNikR : pP342

La liaison de EcNikR sur son promoteur *pnikA* est mesurée au travers de la protection d'un site de coupure, à l'enzyme de restriction PstI, introduit dans la séquence opératrice de *nikA* (Fauquant *et al.*, 2006). Le plasmide pP342 de 2820 pb ne contient qu'un seul site de coupure à l'enzyme de restriction PstI.

La digestion de ce plasmide par ScaI ou HinfI, enzymes qui présentent 1 ou 5 sites de coupure respectivement, a été utilisée pour estimer la liaison non spécifique à l'ADN.

Le mélange réactionnel de 20 µL comprend 20 µM de EcNikR, 200 ng de plasmide dans du tampon 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5% glycérol avec des quantités croissantes de NiCl₂. Une incubation de 25 minutes à 20°C est requise.

Après quoi 1 unité de PstI et/ou ScaI ou HinfI est ajoutée au milieu réactionnel, une seconde incubation d'une heure a lieu à température ambiante. Le produit de la digestion est déposé sur un gel d'agarose de 0.8% ; après migration le gel est coloré au BET.

VII.13.3. Plasmide HpNikR et HpFUR : pHP2S

La liaison d'HpNikR et d'HpFUR sur la région intergénique est mesurée au travers de la protection de multiples sites de coupure, aux enzymes de restriction BsrBI, HinfI, SspI et PstI. La carte du plasmide pHP2S de 3003 pb est présentée ci-après.

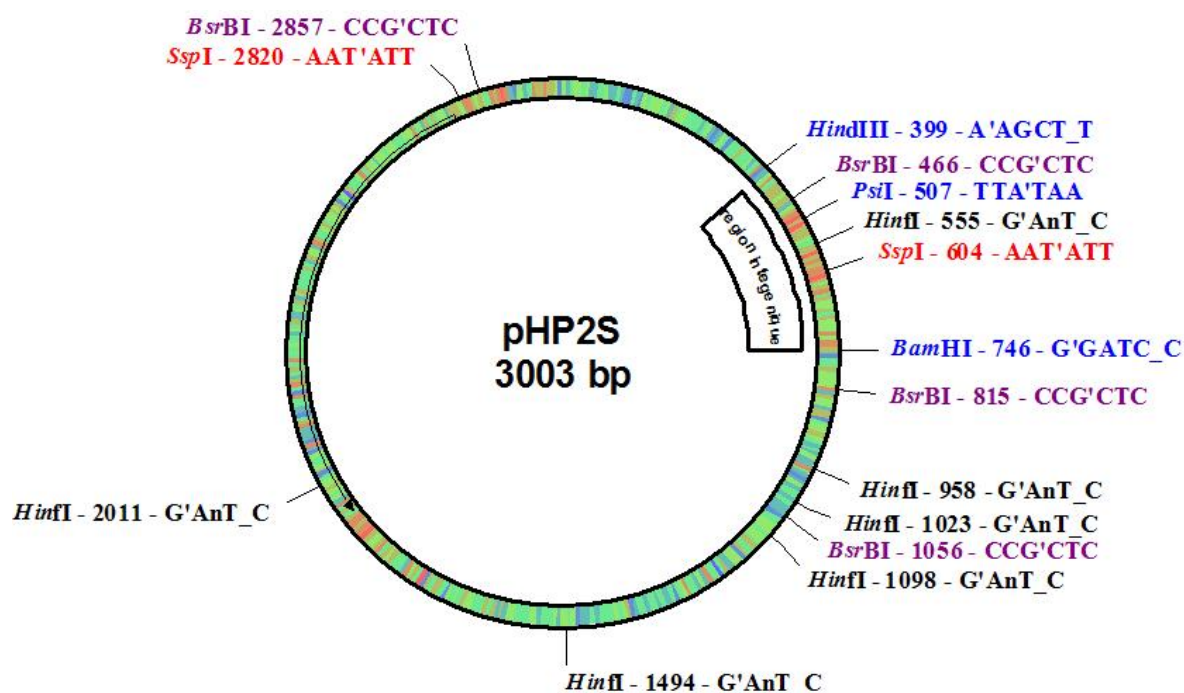


Figure VII.9 Carte du plasmide pHP2S sur laquelle est précisée la zone d'insertion de la région intergénique entre les sites HindIII et BamHI ainsi que les sites de coupures des enzymes d'intérêts.

En théorie, HpNikR doit assurer la protection du site de coupure de SspI à 604pb (site nikRS2), du site de coupure PstI à 507pb (site NiFu). L'absence de liaison sur le motif prédit par Contreras *et al.* sera vérifiée par la non protection du site de coupure de BsrBI à 466pb. Afin de vérifier la spécificité de liaison d'HpNikR sur ces motifs, l'absence de liaison sur les sites de coupures de HinfI, BamHI sera testée.

HpFUR doit assurer la protection du site de coupure de HinfI à 555pb (site furS2), du site de coupure PstI à 507pb (site NiFu).

Afin de vérifier la spécificité de liaison d'HpFUR sur ces motifs et l'absence de polymérisation de la protéine sur l'ADN, l'absence de liaison sur les sites de coupures de SspI sera testée. Les bandes pouvant être observées après digestion par les enzymes sont répertoriées dans le tableau ci-après.

Site testé	<i>furS2</i>	<i>nikRS2</i>	<i>nikRS2</i>	<i>nikRS2/NiFu</i>	<i>NiFu</i>	<i>nikR box</i>
Enzyme	<i>HinfI</i>	<i>SspI</i>	<i>SspI/BamHI</i>	<i>SspI/PsiI</i>	<i>PsiI/BamHI</i>	<i>BsrBI</i>
Bandes si aucune protection (Régulateur inactif)	1547 517 403 396 (75 et 65 non vus)	2216 787	2074 787 (142 non vu)	2216 690 (97 non vu)	2764 239	1801 612 349 241
Bandes si protection spécifique (Régulateur actif)	1950 517 396 (75 et 65 non vus)	3003	2074 929	-3003 si SspI et PsiI -2216 787 si PsiI -2313 690 si SspI	3003	1801 961 241

Tableau VII-1 Taille des bandes obtenues après digestion par les enzymes de restriction en absence et en présence de protection de l'ADN par HpNikR et HpFUR.

Les premières conditions expérimentales dérivant des conditions de gel retard ont été testées pour étudier la liaison d'HpNikR et HpFUR sur la région intergénique.

Le mélange réactionnel de 10 μ L comprend entre 2 à 5 μ M de protéine, 20 nM de plasmide dans du tampon 20mM BisTrisBorate pH7.4, 50 mM KCl, 3mM MgCl₂ avec des quantités variables de métal (Ni(II) et/ou Mn(II)). Une incubation de 20 minutes à température ambiante est faite.

Après quoi 3 unités d'enzyme sont ajoutées au milieu réactionnel, une seconde incubation de 30-40 minutes à 37°C a lieu. La réaction est stoppée en ajoutant le bleu de charge qui comprend 10% de glycérol (Concentration finale). Le produit de la digestion est déposé sur un gel d'agarose de 1.5%, après migration le gel est coloré au BET.

En fonction de la concentration initiale de l'enzyme, soit une dilution au préalable dans le tampon réactionnel sans métal est réalisée afin de diminuer la concentration en EDTA et DTT, soit un échange de tampon sur une Micro Bio-Spin® 6 (Biorad) est réalisé à la dernière minute pour changer son tampon. Cette dernière technique tend à altérer l'activité de l'enzyme.

Un second protocole a été mis en place afin de mesurer nettement la liaison d'HpFUR sur la région intergénique en tenant compte des conditions mises au point pour mesurer la liaison d'EcFUR sur le pDT10 (Pecqueur, 2005).

Le mélange réactionnel de 10 μ L (avant digestion) comprend entre 5 μ M d'HpFUR, 10 nM de plasmide dans du tampon 100mM BisTrisPropane pH7.5, 100 mM KCl, 5mM MgCl₂. Une incubation de 30 minutes à température ambiante est faite. La protéine, selon la condition

testée, est ou non métallée au préalable. Le temps d'équilibration pendant la phase de métallation est de 30 minutes à température ambiante.

Quatre unités d'enzyme sont ensuite ajoutées au milieu réactionnel, une seconde incubation d'une heure à 37°C a lieu. La nucléase est ensuite inactivée pendant 20 minutes à 80°C. Le produit de la digestion est ensuite digéré par de la trypsine à 0.25µM (rapport enzyme/substrat : 1/20) pendant 2 heures à 37°C pour se soustraire de l'agrégation de la protéine à l'ADN et de ce fait se soustraire de smear. Le produit de la double digestion est déposé sur un gel d'agarose de 0.8%, après migration le gel est coloré au BET.

VII.14. Cristallisation HpNikR:*nixA* et HpNikR:*ureA*

Les essais de cristallisation ont été faits sur les duplex oligonucléotidiques de 32 pb de *ureA* et de *nixA* présentés en VII.12.4.2 et sur des duplex de 34pb.

HpNikR à 140µM a été métallée avec 1 eq de Ni(II) par sous unité dans du 20mM Tris/HCl pH 7.4, 200mM NaCl. La protéine a ensuite été concentrée sur un Ultrafree de 4mL pour obtenir une concentration proche de 10mg/mL (583µM). Afin de former des complexes Ni-Protéine:ADN, 160µM d'HpNikR-Ni (concentration par sous unité) ont été mis en présence de 40µM de duplex.

Différentes conditions de cristallisation ont été appliquées, seules 4 ont permis l'obtention de cristaux qui se sont avérés être des cristaux de protéine apo sans ADN.

- 100mM AcONa pH 4.6, 2.0 M NaF.
- 100mM HEPES pH7.5, 10 % Isopropanol, 20 % PEG 4000.
- 50mM KH₂PO₄, 20 % PEG 8000.
- 100mM trisodium Citrate pH 5.6, 1.0 M NH₄H₂PO₄

VII.15. Autres techniques

D'autres techniques ont été utilisées, entre autres pour les mesures de cinétique rapide, la détermination du coefficient d'extinction molaire du complexe EcNikR-Ni(II), et le suivi de la précipitation d'EcNikR. Ces différents protocoles sont présentés dans (Diederix *et al.*, soumis à publication; Fauquant *et al.*, 2006).

VII.16. Références

- Blokesch, M., Rohrmoser, M., Rode, S. & Bock, A. (2004). HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J Bacteriol* 186, 2603-2611.
- Chivers, P. T. & Sauer, R. T. (2000). Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni²⁺-Dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem* 275, 19735-19741.
- Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Labigne, A. (2003). Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 49, 947-963.
- De Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M. A., Giordano, G. & Wu, L. F. (1999). Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 670-674.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2005). In vitro analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187, 7703-7715.
- Dian, C., Schauer, K., Kapp, U., McSweeney, S. M., Labigne, A. & Terradot, L. (2006). Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol* 361, 715-730.
- Diederix, R. E., Fauquant, C., Rodrigue, A., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (soumis à publication). Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II).
- Ernst, F. D., Stoof, J., Horrevoets, W. M., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. & van Vliet, A. H. (2006). NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun* 74, 6821-6828.
- Fauquant, C., Diederix, R. E., Rodrigue, A., Dian, C., Kapp, U., Terradot, L., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. (2006). pH dependent Ni(II) binding and aggregation of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* NikR. *Biochimie* 88, 1693-1705.
- Ferguson, K. A. (1964). Starch-Gel Electrophoresis--Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides. *Metabolism* 13, SUPPL:985-1002.
- Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal Biochem* 237, 260-273.
- McCall, K. A. & Fierke, C. A. (2000). Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Anal Biochem* 284, 307-315.
- Orchard, K. & May, G. E. (1993). An EMSA-based method for determining the molecular weight of a protein--DNA complex. *Nucleic Acids Res* 21, 3335-3336.
- Pecqueur, L. (2005). Etude du rôle du zinc et des cystéines dans la dimérisation de la protéine FUR d'*E.coli* : une approche structurale par RMN. *Thèse soutenue à l'université Joseph Fourier Grenoble I*.
- Reshetnyak, Y. K., Koshevnik, Y. & Burstein, E. A. (2001). Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys J* 81, 1735-1758.
- Stryer, L. (1965). The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* 13, 482-495.

Uversky, V. N., Winter, S. & Lober, G. (1998). Self-association of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonate molecules: spectroscopic characterization and application to the investigation of protein folding. *Biochim Biophys Acta* 1388, 133-142.

Wang, Y., Hemmingsen, L. & Giedroc, D. P. (2005). Structural and functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CmtR, a PbII/CdII-sensing SmtB/ArsR metalloregulatory repressor. *Biochemistry* 44, 8976-8988.

Wang, Z., Schmitt, M. P. & Holmes, R. K. (1994). Characterization of mutations that inactivate the diphtheria toxin repressor gene (dtxR). *Infect Immun* 62, 1600-1608.

Annexes

Annexe A : Matériel supplémentaire de la communication

Supporting Material belonging to:

Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II)

Rutger E.M. Diederix, Caroline Fauquant, Agnès Rodrigue, Marie-Andrée Mandrand-Berthelot, and
Isabelle Michaud-Soret

I. When NikR is in excess over Ni(II), no aggregates are present.

Dynamic light scattering experiments were performed with wt NikR in the absence and presence of various Ni(II) concentrations (Figure S1). NikR was 20 μ M (20mM Hepes pH 8, 0.1 M NaCl). The experiments were recorded using a Zetasizer nanoS from Malvern Instruments using a 50 μ L quartz cuvette at 293K. NikR was allowed to incubate for 20 min with NiSO₄ prior to the measurements. When NikR is in 10-fold or higher excess over Ni(II), no aggregation is observable (Fig. S1A). At higher concentration of Ni(II), aggregation is observed (Fig. S1B), but this disappears with time. It can be concluded that under the conditions of the UV/vis titrations as well as the Ni(II) binding kinetics experiments, Ni(II)-induced NikR aggregation does not play a role.

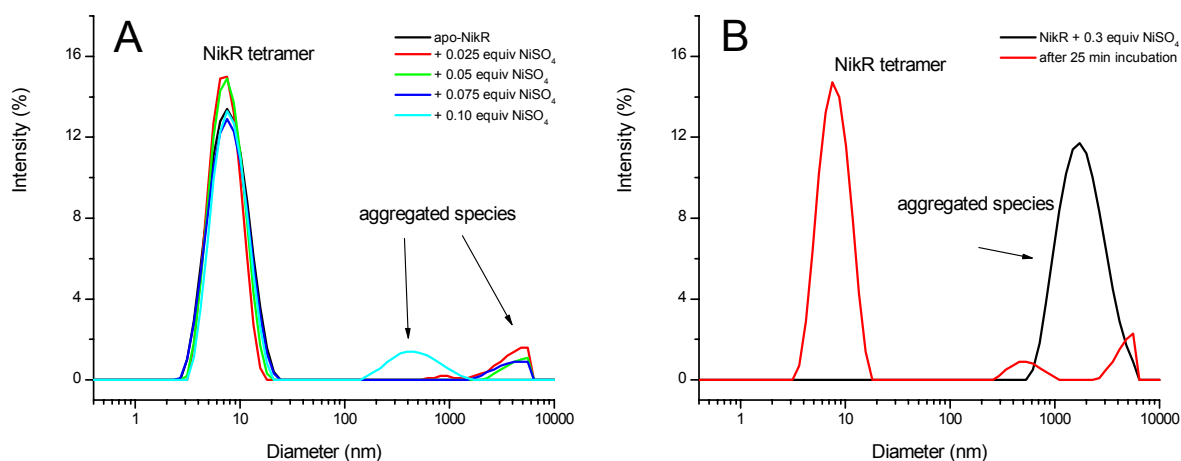


Figure S1. Dynamic light scattering of NikR in the absence and presence of increasing Ni(II). A) A titration with Ni(II) up to 0.1 equivalent. Tetrameric NikR, corresponding to the species with diameter ~7.5 nm, is the major species present, representing 100, 91, 95, 95 and 87 respectively, of the total intensities of NikR with increasing Ni(II) concentration. B) NikR with 0.3 equivalent Ni(II). Initially all the protein is present in the form of large aggregates

II. Determining the K_D with $[\text{NikR}] \gg [\text{Ni(II)}]$ by UV/vis titrations.

Ni(II) titrations were performed with Q2E NikR in 20 mM Hepes pH 8.0, 0.1 M NaCl, 293 K. Q2E NikR concentrations used were 0.6, 0.94, 1.1, 1.5, 2, 3, 3.1, 6, 12.6, 60, 215, and 860 μM . The mixtures were allowed to equilibrate for at least 30 min after addition of the NiSO_4 before UV/vis spectra were acquired. Depending on the protein concentration, cuvettes with optical path lengths of 0.1, 1 and 10 cm were used. The ‘apparent extinction coefficient’ was defined as the linear dependence of absorbance at 302 nm on $[\text{NiSO}_4]$ between 0 and 0.1 equivalents. The apparent extinction coefficient shows a hyperbolic dependence on $[\text{NikR}]$, as justified below.

NikR is a tetrameric protein, with 4 His₃Cys sites capable of Ni(II)-binding with high affinity (HA sites). No co-operativity between the sites is present, as evidenced by linear Ni(II) binding curves [1]. If $[\text{Ni(II)}]$ remains less than 10% of $[\text{NikR}]$, we can consider independent binding of Ni(II) to each of the sites representing the macroscopic dissociation constant. For a simple binding equilibrium $\text{Ni} + \text{NikR} \rightleftharpoons \text{Ni-NikR}$:

$$K_D = \frac{[\text{NikR}]_{\text{free}} \cdot [\text{Ni(II)}]_{\text{free}}}{[\text{Ni-NikR}]} \quad (1)$$

When $[\text{NikR}]_{\text{tot}} \gg [\text{Ni(II)}]_{\text{tot}}$ it follows that $[\text{NikR}]_{\text{free}} \approx [\text{NikR}]_{\text{tot}}$ and thus:

$$[\text{Ni(II)}]_{\text{free}} = [\text{Ni(II)}]_{\text{tot}} - [\text{Ni-NikR}] \quad (2)$$

Substitution of eq. 2 in eq. 3, and subsequent rearrangement gives:

$$[\text{Ni-NikR}] = \frac{[\text{Ni(II)}]_{\text{tot}} \cdot [\text{NikR}]_{\text{tot}}}{(K_D + [\text{NikR}]_{\text{tot}})} \quad (3)$$

The linear increase in absorbance with increasing Ni(II) concentration corresponds to the formation of Ni-NikR. The ratio $[\text{Ni-NikR}]/[\text{Ni(II)}]_{\text{tot}}$ can thus be equated to the ratio of this linear increase in absorbance (called apparent extinction coefficient) and the extinction coefficient:

$$\frac{\varepsilon_{302}(\text{apparent})}{\varepsilon_{302}} = \frac{[\text{Ni-NikR}]}{[\text{Ni(II)}]_{\text{tot}}} \quad (4)$$

Substitution into eq. 3 and subsequent rearrangement gives the hyperbolic relationship (eq. 5):

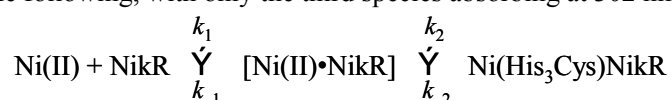
$$\varepsilon_{302}(\text{apparent}) = \varepsilon_{302} \cdot \frac{[\text{NikR}]_{\text{tot}}}{(K_d + [\text{NikR}]_{\text{tot}})} \quad (5)$$

III. Experimental details of the filter binding assays and fitting of the data.

The filter binding assay data were analyzed using DynaFit [2]. We assumed independent binding to two categories of binding sites, each with a different affinity for Ni(II) [1]. The HA site is considered one category, while all other sites that are rapidly depleted by EDTA are considered the second category (low affinity, LA sites). Only one HA site is present per NikR monomer, and, for sake of simplicity, we assumed only 3 LA sites, each with equal affinity for Ni(II). These represent the entirety of sites present on NikR capable of binding Ni(II). It was assumed that wt and Q2E NikR possess both HA and LA sites; EDTA-washed wt and Q2E NikR only HA sites, and Q2E/H89N NikR only LA sites. The data were fit independently and the resulting K_D 's averaged. The K_D of the LA binding site was first determined using the data for Q2E/H89N NikR and this value used to fit the data for wt and Q2E NikR.

IV. Fitting of the Ni(II)-binding kinetics to NikR.

Non-linear least-squares fitting of the stopped-flow traces to a single exponential gives imperfect fits, with clear deviations at the beginning of the reactions (i.e. evidence of a lag-phase). Also, the rate constants derived from this fitting display a hyperbolic dependence on [NikR]. Together, this can be taken as evidence of a mechanism of binding that involves an intermediate species and that the species giving the signal (i.e. absorbs at 302 nm) is the species that follows the intermediate in the reaction sequence [3, 4]. The most simple and likely reaction mechanism is a two-step binding mechanism. From a structural point of view, this is also likely; the HA, His₃Cys site is situated in the interior of the protein, and the most direct route for Ni(II) ion to the HA site is through a cluster of His residues located on the surface. Thus, the most reasonable mechanism is the following, with only the third species absorbing at 302 nm:



The data sets were fit simultaneously, using DynaFit [2], assuming $\epsilon_{302} = 10,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for NiNikR (this work). The model described above was used, with the following modification: the protein was assumed to be dimeric and to contain two sites, i.e. each Ni(II) is able to recognize two individual sites and bind accordingly. This was done in an attempt to take the tetrameric nature of NikR, with 4 HA sites, into account. Fitting using a model including all 4 sites requires simultaneous solution of 64 binding equilibria, which is too many for the Dynafit program. The validity of the simplification to assume dimeric NikR was confirmed by fitting using a more elaborate model assuming NikR is trimeric, and also assuming that NikR is tetrameric, but that it cannot bind more than two Ni(II) in the HA site at any given time. The results from these fitting procedures are essentially the same (as shown in Section V, see below), confirming that simplification of the binding model is permitted. Also, simulation using the resulting kinetic parameters of the degree of binding of the sites in NikR, assuming tetrameric NikR, indicated that the fraction of NikR containing more than two bound Ni(II) is negligible under the conditions of the experiments. The kinetic constants obtained from this fit correspond well to analytical fitting of the curves (see below). The reason that little effect is seen is probably that the excess of NikR over Ni(II) is over tenfold, and thus the 4 Ni(II) sites of each tetramer can be viewed individually.

The data were also fit analytically, using the following expression [3]:

$$y = \alpha \left[1 + \frac{\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_1 t} - \frac{\lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} \right] \quad (6)$$

with α = amplitude, λ_1 = rate constant of the slow phase and λ_2 = rate constant of the fast phase, respectively. The dependent variable y is the baseline-corrected absorbance at 302 nm, which equates to the product ($[\text{NiNikR}] \cdot \epsilon_{302}$). This expression was used for non-linear regression, one curve at a time. For a two-step mechanism, the parameters λ_1 , λ_2 and α depend on the 4 rate constants of the reaction as follows [3]:

$$\lambda_1 = \frac{k_1[\text{NikR}](k_2 + k_{-2}) + k_{-1}k_{-2}}{k_1[\text{NikR}] + k_{-1} + k_2 + k_{-2}} \quad (7)$$

$$\lambda_2 = k_1[\text{NikR}] + k_{-1} + k_2 + k_{-2} \quad (8)$$

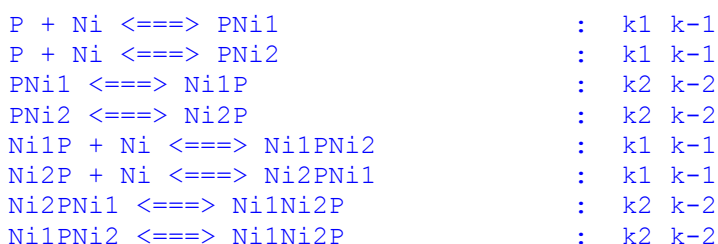
$$\alpha = \frac{K_1 K_2 [\text{NikR}]}{1 + K_1 [\text{NikR}] + K_1 K_2 [\text{NikR}]} \quad (9)$$

We found that the slow phase gave a hyperbolic dependence, whereas the fast phase showed too much scattering to be reasonably interpreted as a straight line. Direct fitting to eq. 7 yields $(k_2 + k_{-2}) = 0.1064$, in excellent agreement with the DynaFit results. At low $[\text{NikR}]$ ($<10 \mu\text{M}$), the linear dependence of the slow phase on $[\text{NikR}]$ has a slope $k_1(k_2 + k_{-2})/(k_{-1} + k_2 + k_{-2})$ and a y-axis cutoff $= k_{-1}k_{-2}/(k_{-1} + k_2 + k_{-2})$. Linear fitting at $[\text{NikR}] < 10 \mu\text{M}$ yields $k_1 = 16.9 (\pm 0.5) \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_{-1}k_{-2}/(k_2 + k_{-2}) = 0.00513 (\pm 6.74 \cdot 10^{-4})$. This is in good agreement with the values expected from the DynaFit fits (which yields the calculated values 18.8 and 0.00598 for the slope and cutoff, respectively). Simulation of the hyperbolic curve with the values obtained from DynaFit also gave excellent results. Unfortunately, the hyperbolic curve cannot be fit independently, as the kinetic constants are too interdependent (as we cannot use extra information deriving from the fast phase, λ_2).

V. The applied Dynafit models

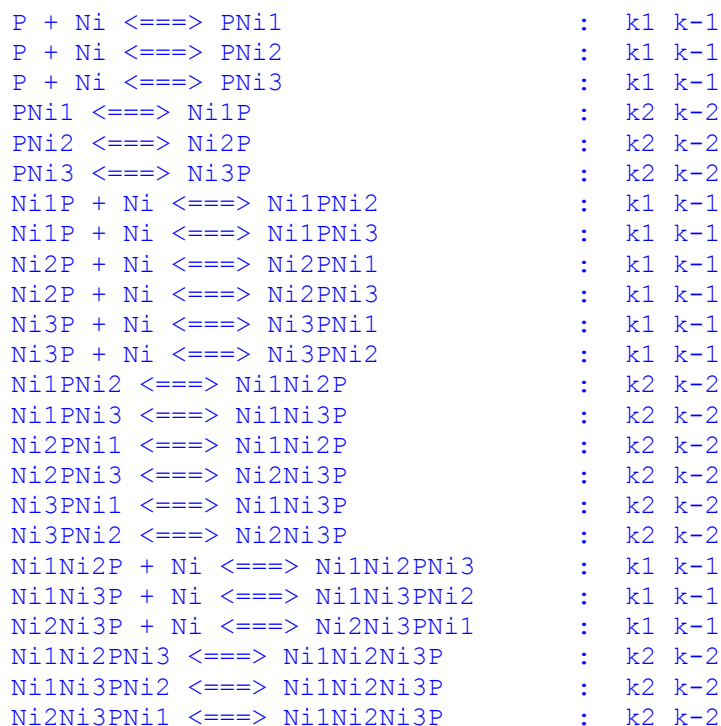
Model I: NikR as a dimer.

Each of both HA sites binds Ni(II) individually, through an intermediate. This results in 8 equilibria between 8 NikR species. The Ni(II) sites are named with arabic numerals. When the Ni(II) is bound to the (spectroscopically silent) intermediate, the letters Ni1 or Ni2 follow the letter P, and when bound to the final site, the letters Ni1 or Ni2 precede the letter P.

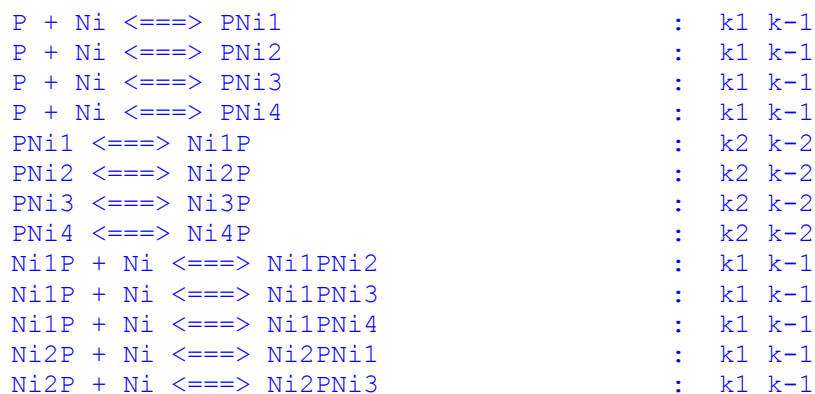


Model II: NikR as a trimer.

Each of the 3 HA sites binds Ni(II) individually, through an intermediate. This results in 24 equilibria between 20 NikR species. Naming of the species is analogous to above.

*Model III: NikR as a tetramer.*

Each of the 4 HA sites binds Ni(II) individually, through an intermediate. This results in 64 equilibria between 48 NikR species. Naming of the species is analogous to above. Because the maximum number of equilibria allowed by the Dynafit fitting program is 50, it was necessary to simplify the mechanism. For this reason, the final 20 equilibria (indicated in red) were not used. The species involved in these equilibria contain three or more Ni(II) bound to the HA site, and are expected to be present at any given time in very low quantities under the conditions of the experiment (i.e. with an 10-fold excess or more of HA sites over Ni(II)). Simulations of the progress of the species with time, using the kinetic constants derived earlier are shown in Figure S2, below. Indeed, the percentage of signal at 302 nm derived from NikR containing only a single Ni(II) bound to the HA site is never lower than 85%, and the percentage of NikR tetramers containing more than two Ni(II) ions bound is negligible.



Ni2P + Ni <==> Ni2PNi4	:	k1 k-1
Ni3P + Ni <==> Ni3PNi1	:	k1 k-1
Ni3P + Ni <==> Ni3PNi2	:	k1 k-1
Ni3P + Ni <==> Ni3PNi4	:	k1 k-1
Ni4P + Ni <==> Ni4PNi1	:	k1 k-1
Ni4P + Ni <==> Ni4PNi2	:	k1 k-1
Ni4P + Ni <==> Ni4PNi3	:	k1 k-1
Ni1PNi2 <==> Ni1Ni2P	:	k2 k-2
Ni1PNi3 <==> Ni1Ni3P	:	k2 k-2
Ni1PNi4 <==> Ni1Ni4P	:	k2 k-2
Ni2PNi1 <==> Ni1Ni2P	:	k2 k-2
Ni2PNi3 <==> Ni2Ni3P	:	k2 k-2
Ni2PNi4 <==> Ni2Ni4P	:	k2 k-2
Ni3PNi1 <==> Ni1Ni3P	:	k2 k-2
Ni3PNi2 <==> Ni2Ni3P	:	k2 k-2
Ni3PNi4 <==> Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni4PNi1 <==> Ni1Ni4P	:	k2 k-2
Ni4PNi2 <==> Ni2Ni4P	:	k2 k-2
Ni4PNi3 <==> Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni2P + Ni <==> Ni1Ni2PNi3	:	k1 k-1
Ni1Ni2P + Ni <==> Ni1Ni2PNi4	:	k1 k-1
Ni1Ni3P + Ni <==> Ni1Ni3PNi2	:	k1 k-1
Ni1Ni3P + Ni <==> Ni1Ni3PNi4	:	k1 k-1
Ni1Ni4P + Ni <==> Ni1Ni4PNi2	:	k1 k-1
Ni1Ni4P + Ni <==> Ni1Ni4PNi3	:	k1 k-1
Ni2Ni3P + Ni <==> Ni2Ni3PNi1	:	k1 k-1
Ni2Ni3P + Ni <==> Ni2Ni3PNi4	:	k1 k-1
Ni2Ni4P + Ni <==> Ni2Ni4PNi1	:	k1 k-1
Ni2Ni4P + Ni <==> Ni2Ni4PNi3	:	k1 k-1
Ni3Ni4P + Ni <==> Ni3Ni4PNi1	:	k1 k-1
Ni3Ni4P + Ni <==> Ni3Ni4PNi2	:	k1 k-1
Ni1Ni2PNi3 <==> Ni1Ni2Ni3P	:	k2 k-2
Ni1Ni2PNi4 <==> Ni1Ni2Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni3PNi2 <==> Ni1Ni2Ni3P	:	k2 k-2
Ni1Ni3PNi4 <==> Ni1Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni4PNi2 <==> Ni1Ni2Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni4PNi3 <==> Ni1Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni2Ni3PNi1 <==> Ni1Ni2Ni3P	:	k2 k-2
Ni2Ni3PNi4 <==> Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni2Ni4PNi1 <==> Ni1Ni2Ni4P	:	k2 k-2
Ni2Ni4PNi3 <==> Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni3Ni4PNi1 <==> Ni1Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni3Ni4PNi2 <==> Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni2Ni3P + Ni <==> Ni1Ni2Ni3PNi4	:	k1 k-1
Ni1Ni2Ni4P + Ni <==> Ni1Ni2Ni4PNi3	:	k1 k-1
Ni1Ni3Ni4P + Ni <==> Ni1Ni3Ni4PNi2	:	k1 k-1
Ni2Ni3Ni4P + Ni <==> Ni2Ni3Ni4PNi1	:	k1 k-1
Ni1Ni2Ni3PNi4 <==> Ni1Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni2Ni4PNi3 <==> Ni1Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni1Ni3Ni4PNi2 <==> Ni1Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2
Ni2Ni3Ni4PNi1 <==> Ni1Ni2Ni3Ni4P	:	k2 k-2

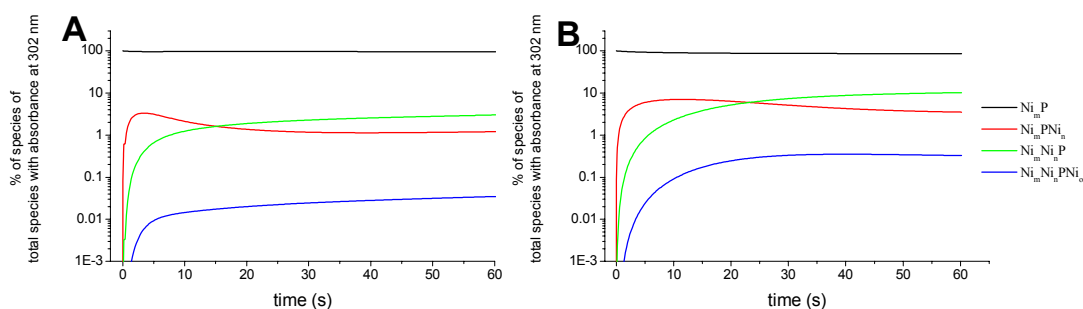


Figure S2. Percentage of Ni(II)-containing NikR species with at least one Ni(II) bound in the HA site, of the sum of all NikR species containing at least one Ni(II) in the HA site. The percentages result from simulations using the kinetic constants as described in the manuscript, using Model III. In A, the ratio Ni:NikR is 1:20 and in B, the ratio is

The results of fitting of the data using these three models are shown in Table 1 below. The data that were fitted simultaneously are the five-trace averages of respective mixtures of Ni(II) and NikR in fixed ratios of 1:20 and 1:10, respectively, with Ni(II) varying from 0.2 to 64 μM ; and mixture with a fixed Ni(II) concentration of 6 μM , and NikR ranging from 10 to 105 μM .

	k_1 ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_{-2} (s^{-1})
Model I	3.65 ± 0.46	0.095 ± 0.015	0.088 ± 0.016	0.0123 ± 0.0012
Model II	4.56 ± 0.94	0.091 ± 0.005	0.088 ± 0.011	0.0139 ± 0.0011
Model III	4.39 ± 0.42	0.110 ± 0.004	0.088 ± 0.002	0.0117 ± 0.0011
	k_{on} ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	Sum of squares
Model I	1.76	0.0064	0.363	$1.11 \cdot 10^{-7}$
Model II	2.24	0.0071	0.316	$1.45 \cdot 10^{-7}$
Model III	2.24	0.0068	0.334	$1.98 \cdot 10^{-7}$

VI References

- (1) Fauquant C, Diederix REM, Rodrigue A, Dian C, Kapp U, Terradot L, Mandrand-Berthelot MA, Michaud-Soret I (2006) *Biochimie* 88: 1693-1705.
- (2) Kuzmic P (1996) *Anal Biochem* 237: 260-273.
- (3) Johnson KA (1986) *Meth Enzymol* 134: 677-705.
- (4) Halford SE (1975) *Biochem J* 149: 411-422.

Annexe B : Modèles appliqués pour l'ajustement des données

Modèle simple

Ce modèle a été employé dans deux situations, soit pour déterminer le Kd apparent d'un site métallique présent dans une sous unité monomérique soit pour déterminer le Kd apparent d'un complexe Protéine métallée/ADN. Dans cette seconde condition cela implique que la protéine soit 100% métallée.

Le modèle est le suivant :



D'après la loi d'action des masses :

$$[A]_{\text{libre}} \times [B]_{\text{libre}} \times k_1 = k_2 \times [AB]$$

$$\text{soit} \quad Kd = \frac{[A]_{\text{libre}} \times [B]_{\text{libre}}}{[AB]} \quad \text{équation 1}$$

$$\text{on a} \quad [A]_{\text{libre}} = [A]_{\text{Tot}} - [AB] \quad \text{et} \quad [B]_{\text{libre}} = [B]_{\text{Tot}} - [AB]$$

alors l'équation 1 devient :

$$Kd = \frac{([A]_{\text{Tot}} - [AB]) \times ([B]_{\text{Tot}} - [AB])}{[AB]} \quad \text{équation 2}$$

On développant l'équation 2, on obtient :

$$0 = [AB]^2 + [AB] \times (-Kd - [A]_{\text{Tot}} - [B]_{\text{Tot}}) + ([A]_{\text{Tot}} \times [B]_{\text{Tot}}) \quad \text{équation 3}$$

qui équivaut à résoudre une équation quadratique :

$$0 = ax^2 + bx + c \text{ dont la solution est } x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

où dans notre situation $x = [AB]$, $a = 1$, $b = (-Kd - [A]_{\text{Tot}} - [B]_{\text{Tot}})$ et $c = ([A]_{\text{Tot}} \times [B]_{\text{Tot}})$

La solution de l'équation 3 est :

$$[AB] = \frac{-(-Kd - [A]_{\text{Tot}} - [B]_{\text{Tot}}) - \sqrt{(-Kd - [A]_{\text{Tot}} - [B]_{\text{Tot}})^2 - 4 \times ([A]_{\text{Tot}} \times [B]_{\text{Tot}})}}{2}$$

Ici on connaît $[A]_{\text{Tot}}$, $[B]_{\text{Tot}}$ et l'on mesure $[AB]$.

Modèle de Hill

Ce modèle a été employé par défaut quand le modèle simple ne permettait pas d'ajuster les données. Son application est parfois abusive mais traduit une complexité dans les mécanismes de liaison.

Théoriquement un tel modèle permet de rendre compte avec son coefficient de Hill « n » de la coopérativité de liaison d'un ligand à un composé donné, si :

$n > 1$ - Réaction de coopérativité positive

$n < 1$ - Réaction de coopérativité négative

$n = 1$ - absence de coopérativité

L'équation utilisée est la suivante : $[AB] = [AB]_{\max} \times \frac{[A]_{\text{libre}}^n}{[Kd]^n + [A]_{\text{libre}}^n}$ où $[AB]_{\max}$ est égal à $[B]_{\text{Tot}}$ (facteur limitant). Généralement $[A]_{\text{libre}}$ est assimilé à $[A]_{\text{Tot}}$ lorsque $[A] \gg [B]$.

Annexe C : Liaison d'HpNikR sur *NiFu* et *nikRS2* mesurée par EMSA

Liaison sur *NiFu* et *nikRS2* en absence de sel métallique dans le tampon de migration :

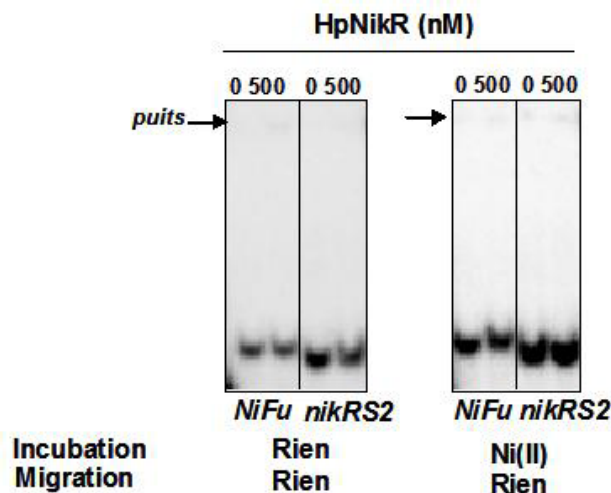


Figure C.1 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* – *nikRS2*) en absence de sel métallique dans le tampon de migration. HpNikR (0 et 500 nM) incubé avec 500pM d'ADN en présence de dIdC à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et aucun sel ou 100µM de Ni(II)). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du NiCl₂ à 100µM. Une perte moyenne de 10% de la radioactivité totale est observée.

Liaison sur *NiFu* et *nikRS2* en présence de 100µM de Ni(II) dans le tampon de migration :

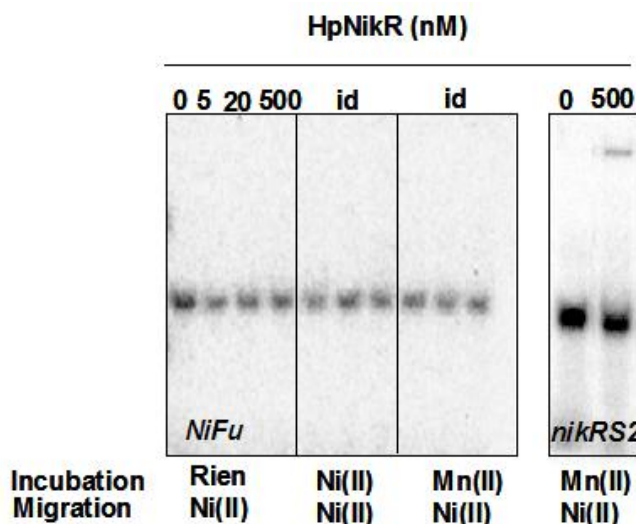


Figure C.2 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* – *nikRS2*) en présence d'un excès de Ni(II) dans le tampon de migration. HpNikR (0 et 500 nM) incubé avec 500pM d'ADN en présence de dIdC à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et aucun sel ou 100µM de Ni(II) ou Mn(II)). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du NiCl₂ à 100µM. Une perte moyenne de 10% de la radioactivité totale est observée.

Liaison sur *NiFu* et *nikRS2* en présence de 3mM de Mg(II) dans le tampon de migration :

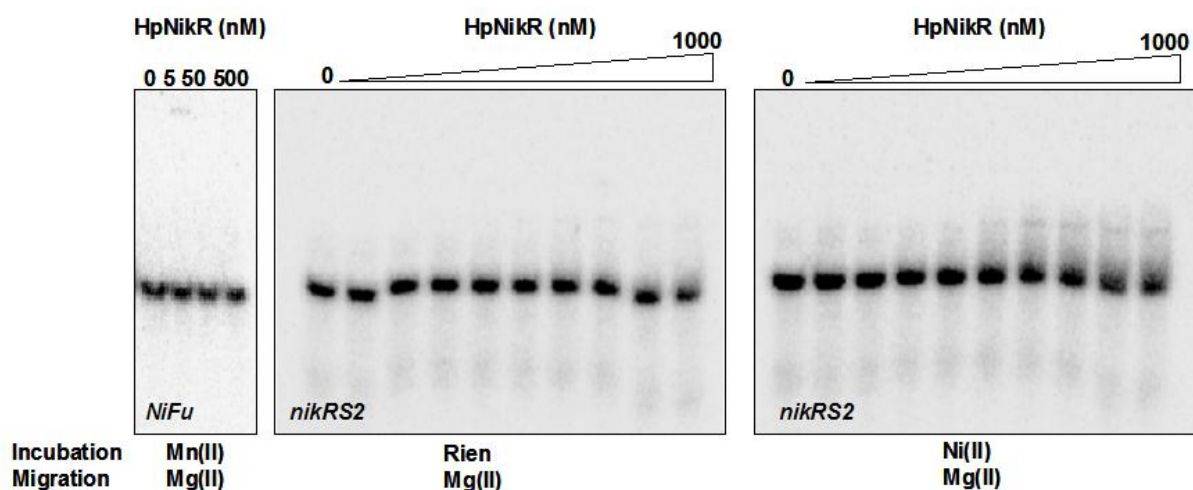


Figure C.3 Liaison d'HpNikR à l'ADN (*NiFu* - *nikRS2*) en présence d'un excès de Mg(II) dans le tampon de migration. HpNikR (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 500 et 1000nM) incube avec 500pM d'ADN en présence de dIdC à 1.5µg/mL pendant 20 minutes dans le tampon de complexation (20mM BisTris Borate pH7.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2.5% Glycérol, 0.1% Triton et aucun sel ou 100µM de Ni(II) ou Mn(II)). Les complexes réactionnels ont migré dans un gel d'acrylamide à 8%. Le gel et le tampon de migration (100mM BisTris Borate pH7.4) contenaient du NiCl₂ à 100µM. Une perte moyenne de 10% de la radioactivité totale est observée.

**Propriétés de métallation et de liaison à l'ADN
de NikR d'*Escherichia coli* et de NikR et FUR d'*Helicobacter pylori***

Les facteurs de transcription NikR et FUR sont impliqués dans l'homéostasie des métaux. Les propriétés de métallation et de liaison à l'ADN de NikR d'*E.coli* (Ec) et d'*H.pylori* (Hp) ont été comparées. EcNikR, protéine tétramérique, lie 8 nickels par sous unité dont un nickel dans un site dit de haute affinité ayant un Kd submicromolaire. Les autres sites métalliques, de plus basse affinité, sont impliqués dans le processus d'agrégation Ni- et pH-dépendant. HpNikR, partage des propriétés de métallation avec EcNikR, dont la liaison possible de différents métaux dans son site de haute affinité (Cu(II), Ni(II), Co(II)). Les 4 sites de haute affinité de cette protéine semblent égaux 2 à 2. La métallation des premiers sites faciliterait une « fermeture de la protéine » permettant la métallation des deux derniers sites. La métallation de ces 4 sites semble suffire pour qu'HpNikR puisse lier l'ADN. Cependant cette liaison serait améliorée en présence d'un métal stabilisateur dans d'autres sites. Selon les séquences opératrices, le métal et la technique employée, l'affinité d'HpNikR métallée pour l'ADN varie. En présence d'un excès de Ni(II), HpNikR se lie à *pureA* et à *pnixA* avec un Kd de 2,5 et 1,7 nM mais se lie faiblement à *pnikR* et *pexbB*. En présence d'un excès de Ni(II) puis de Mn(II), HpNikR se lie à *pnikR* et à *pexbB* avec un Kd de 38 et 24 nM. FUR d'*H.pylori* (HpFUR), un métallorégulateur Fe-dépendant, a aussi été caractérisé dans le but d'étudier sa co-régulation avec HpNikR de la région intergénique *nikR-exbB*. HpFUR est dimérique et contient au moins deux sites métalliques : un site structural et un site de régulation permettant l'activation pour la liaison à l'ADN.

Mots Clés: Métallorégulateur, NikR, FUR, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, nickel, fer, homéostasie, spectroscopie, affinité, dichroïsme circulaire, interaction ADN/Protéine

**Metal and DNA binding properties of
NikR from *Escherichia coli* and of NikR and FUR from *Helicobacter pylori***

The transcription factors NikR and FUR are involved in the nickel and iron homeostasis. Comparative studies of metal and DNA binding properties of *E.coli* (Ec) and *H.pylori* (Hp) NikR are reported. EcNikR, a tetramer, binds up to 8 nickels per monomer. EcNikR contains two types of metal sites. The first one, a high affinity site, binds one nickel with a submicromolar dissociation constant. Other sites with a lower affinity are involved in a Ni(II) and pH dependant aggregation process. HpNikR and EcNikR share common metal binding properties such as the binding of different transition metals (Cu(II), Ni(II), Co(II)) in their high affinity sites. The high affinity sites of HpNikR are equal two by two. It has been proposed that metal binding in the two first sites allows protein "closure" that leads to metal binding in the last two sites. Metal incorporation in the high affinity sites seems to be enough to lead to Protein/DNA complex formation. However metal binding in a second stabilisation site enhances the complex stability. Depending on the operator sequence, the metal and the technique used, holo-HpNikR affinity to DNA varies. With an excess of Ni(II), HpNikR binds *pureA* and *pnixA* with a Kd of 2.5 and 1.7 nM but binds weakly *pnikR* and *pexbB*. With an excess of Ni(II) and Mn(II), HpNikR binds *pnikR* and *pexbB* with a Kd of 38 and 24 nM. Finally, FUR from *H.pylori* (HpFUR), an iron dependent metalloregulator, has been characterised in order to study its co-regulation with HpNikR on the *nikR-exbB* intergenic region. HpFUR is a dimer which contains at least two metal binding sites: a structural site and a regulatory site which would allow its activation and its DNA binding.

Keywords: Metalloregulator, NikR, FUR, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, nickel, iron, homeostasis, spectroscopy, affinity, circular dichroism, DNA binding

